
ALDOLASI C UMANA: STUDIO DEGLI INTERATTORI MOLECOLARI NEL SNC E NUOVE POSSIBILI ATTIVITÀ *MOONLIGHT*

Dott. Roberto Palomba

Dottorato in Scienze Biotechnologiche – 24° ciclo
Indirizzo Biotechnologie mediche
Università di Napoli Federico II



Dottorato in Scienze Biotechologiche – 24° ciclo
Indirizzo Biotecnologie mediche
Università di Napoli Federico II



ALDOLASI C UMANA: STUDIO DEGLI INTERATTORI MOLECOLARI NEL SNC E NUOVE POSSIBILI ATTIVITÀ *MOONLIGHT*

Dott. Roberto Palomba

Dottorando:	Dott. Roberto Palomba
Relatore:	Prof. Margherita Ruoppolo
Correlatore:	Prof. Pasqualina Buono
Coordinatore:	Prof. Giovanni Sannia

INDICE

RIASSUNTO DELL'ELABORATO	pag. 3
1) INTRODUZIONE	pag. 9
1.1) Le aldolasi nei mammiferi	pag. 9
1.2) Aldolasi C: organizzazione strutturale del gene nei mammiferi e comparazione tra le specie	pag. 11
1.3) Analisi della distribuzione del messaggero e della proteina aldolasi C nel SNC dei mammiferi	pag. 12
1.4) Identificazione di putativi interattori molecolari di aldolasi C	pag. 16
1.4.1) NPDC1: <i>Neural Proliferation Differentiation and Control 1</i>	pag. 17
1.4.2) Ciclina A: ruolo nel ciclo cellulare e nel differenziamento	pag. 18
2) SCOPO DELLA TESI	pag. 21
3) MATERIALI E METODI	pag. 23
3.1) Colture cellulari	pag. 23
3.2) Costrutti utilizzati e metodiche di clonaggio	pag. 23
3.3) Trasfezioni transienti	pag. 26
3.4) Estratti proteici totali	pag. 26
3.5) Estratti proteici frazionati	pag. 26
3.6) <i>GST-pull-down</i>	pag. 27
3.7) Esperimenti di co-immunoprecipitazione	pag. 29
3.8) <i>SDS PAGE e Western Blot</i>	pag. 31
3.9) Esperimenti di immunofluorescenza	pag. 32
4) RISULTATI	pag. 35
4.1) Analisi <i>in silico</i> dei putativi interattori molecolari della proteina aldolasi C	pag. 35
4.2) Validazione delle interazioni delle proteine NPDC1 e ciclina A con aldolasi C mediante esperimenti di <i>GST-pull-down</i>	pag. 36
4.3) Co-immunoprecipitazione di NPDC1 e ciclina A con anticorpo monoclonale anti-Aldolasi C	pag. 39
4.4) Co-immunoprecipitazione di NPDC1 e ciclina A con la resina "Anti- FLAG" da estratti proteici totali ottenuti da cellule Neuro2A trasfettate con il costrutto p3xFLAG-Aldolasi C	pag. 40
4.5) Analisi dell'espressione di aldolasi C, ciclina A e fosfo ERK 1/2 in cellule PC12 indotte al differenziamento neuronale con NGF ed in cellule PC12 trasfettate con il costrutto p3xFLAG-Aldolasi C	pag. 41
4.6) Analisi della compartimentalizzazione cellulare delle proteine aldolasi C e ciclina A in cellule PC12 indotte al differenziamento neuronale con NGF	pag. 47

5) CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE	pag. 51
6) BIBLIOGRAFIA	pag. 53
7) APPENDICE: pubblicazioni e comunicazioni prodotte durante il dottorato	pag. 61

RIASSUNTO DELL'ELABORATO:

L'enzima "fruttosio 1,6 bisfosfato aldolasi", più comunemente noto come "aldolasi" è un enzima della via glicolitica appartenente alla classe delle liasi che catalizza la scissione del fruttosio 1,6 bisfosfato in gliceraldeide 3-fosfato e diidrossiacetone-fosfato. Tale reazione rappresenta il quarto *step* della glicolisi; l'aldolasi può catalizzare la reazione in entrambi i sensi. Il nome dell'enzima deriva infatti dalla reazione inversa, una condensazione aldolica.

Nei mammiferi l'aldolasi è presente sotto forma di 3 isoenzimi: aldolasi A, B e C codificati da 3 geni diversi che derivano per duplicazione da un unico gene ancestrale e producono tre proteine distinte con notevole omologia di sequenza all'estremità N-terminale; l'estremità C-terminale differenzia invece le tre proteine, conferendo ad esse specifiche proprietà catalitiche ed antigeniche.

I tre isoenzimi hanno un'espressione tessuto-specifica: l'aldolasi A, ubiquitaria, è espressa in maniera costitutiva, l'aldolasi B è espressa nel fegato in maniera dipendente dall'assunzione di fruttosio, mentre l'aldolasi C è espressa prevalentemente nel Sistema Nervoso Centrale (SNC) dei mammiferi. L'espressione dell'aldolasi C è regolata in maniera spazio-temporale e raggiunge livelli massimi nel cervello adulto.

In particolare, l'espressione di aldolasi C nel SNC dei mammiferi adulti risulta delimitata in alcune regioni, quali: lo strato delle cellule del Purkinje del cervelletto, l'ippocampo, i nuclei talamici, il corpo striato, il midollo allungato, le olive ponto-cerebellari.

Mediante esperimenti di immunoistochimica condotti su cervello di ratto e topo, è stato dimostrato che le proteine aldolasi A e C sono espresse in tipi cellulari complementari: l'aldolasi C è espressa nelle cellule del Purkinje, mentre l'aldolasi A è espressa ad alti livelli in tutti i tipi di neuroni eccetto che nelle cellule del Purkinje dove si ritrova a bassi livelli. Altri studi hanno evidenziato che sia il messaggero che la proteina aldolasi C hanno una distribuzione discontinua nello strato delle cellule del Purkinje dove la proteina definisce un motivo detto a "zebra".

Nel corso degli ultimi anni la proteina aldolasi C è diventata la proteina *marker* più utilizzata per la compartimentalizzazione cerebellare. Essendo espressa solo in alcune cellule del Purkinje nel cervelletto, essa risulta essere distribuita in "strisce" parasagittali. Questa caratteristica distribuzione è stata evidenziata con alta riproducibilità in specie differenti.

Il nostro gruppo di ricerca ha analizzato, l'espressione dei messaggeri delle aldolasi A e C nel SNC dell'uomo ricostruendo una mappa dettagliata della loro distribuzione nel cervello umano. E' stata inoltre analizzata l'espressione delle 2 proteine aldolasi A e C in diverse aree del cervello e del cervelletto umano ed è stata confermata, per la prima volta anche nell'uomo, la distribuzione discontinua a "zebra" dell'aldolasi C nello strato delle cellule del Purkinje del cervelletto. È stata inoltre evidenziata una distribuzione a zebra della proteina anche in altre aree come le olive inferiori e nei nuclei di Goll e Burdach delle corna posteriori del midollo spinale.

L'espressione di aldolasi C e la sua peculiare distribuzione a bande in aree specifiche del SNC nelle quali l'aldolasi A risulta essere co-espressa, è a supporto dell'ipotesi che essa possa avere funzioni aggiuntive oltre al suo ruolo nei processi glicolitici. Finora ben poco si sa sul ruolo fisiologico dell'aldolasi C e non è nota alcuna malattia associata a mutazioni del gene.

Recentemente nel laboratorio dove sto svolgendo il dottorato sono state attivate differenti linee di ricerca volte ad identificare possibili attività *moonlight* della proteina aldolasi C, tra cui l'ottenimento di topi *knock-out* e la ricerca di *partners* molecolari di tale proteina nel SNC dei mammiferi adulti.

Lo scopo del mio progetto di ricerca prevede la caratterizzazione funzionale di alcuni putativi interattori molecolari di aldolasi C recentemente identificati, mediante il sistema del doppio ibrido in lievito, da una libreria di cDNA di cervello di topo adulto. Alcuni dei putativi interattori sono qui elencati:

Atassina 10
<i>Neural Proliferation Differentiation and Control 1</i> (NPDC1)
Paralemmina
<i>Heat Shock Protein 70</i> (HSP70)
<i>Kv Channel interacting protein 1</i> (Kcnip1)
Enolasi γ

L'atassina-10, prodotto del gene SCA10, è una proteina di 55 kDa che appartiene alla famiglia di proteine "*Armadillo repeat*": essa è coinvolta in una grave patologia neurodegenerativa, l'atassia spinocerebellare di tipo 10. Esperimenti di *GST-pull-down* e di co-immunoprecipitazione, condotti nel nostro laboratorio, hanno confermato l'interazione tra l'atassina 10 e l'aldolasi C (manoscritto in preparazione).

NPDC1 è una proteina espressa principalmente nel SNC ed è coinvolta nella complessa regolazione della proliferazione e del differenziamento neuronale: questa proteina aumenta nelle cellule neuronali quando queste smettono di dividersi ed iniziano a differenziare. NPDC1 ha inoltre la capacità di ridurre la proliferazione di precursori neuronali.

L'enolasi γ è l'isoenzima dell'enolasi espresso specificamente nei neuroni, enzima coinvolto nel metabolismo del glucosio ed è considerato un *marker* del differenziamento neuronale.

La paralemmina è una proteina associata alla membrana plasmatica dei neuroni.

L'HSP 70 è una proteina costitutivamente espressa nel cervello dei mammiferi ed il suo ruolo fondamentale è quello di regolare l'attività delle chaperonine.

La proteina KCNIP1 è associata ai canali del potassio Kv4 e ne modula l'attività ed il *trafficking*.

Il mio lavoro è stato inizialmente rivolto a confermare l'interazione tra la proteina aldolasi C e la proteina NPDC1 mediante esperimenti di *GST-pull-down*. Il cDNA del frammento C-terminale (di 222 amminoacidi) della proteina NPDC1 è stato clonato nel vettore di espressione procariotico pGEX che consente di clonare la sequenza codificante per la proteina di interesse *in frame* con la sequenza codificante per la proteina GST (glutathione S-transferasi). La porzione clonata è la stessa identificata nello studio effettuato con il sistema del doppio ibrido. La proteina di fusione ricombinante, GST-NPDC1 frammento (GST-NPDC1 f), dopo essere stata purificata, è stata cimentata con estratti proteici totali ottenuti da tessuti e linee cellulari in cui l'aldolasi C è espressa. In particolare, sono stati utilizzati estratti proteici totali della linea cellulare di neuroblastoma di topo (Neuro2A), estratti proteici totali da cervello di topo adulto ed estratti proteici totali ottenuti da fegato di topo come controllo negativo. Il complesso proteico è separato su SDS-PAGE e trasferito su un filtro di nitrocellulosa; quest'ultimo è stato ibridato con un anticorpo monoclonale diretto contro la proteina aldolasi C. Questi esperimenti hanno confermato l'interazione tra la proteina aldolasi C e la proteina NPDC1.

In seguito abbiamo effettuato analoghi esperimenti di *GST-pull-down* allo scopo di verificare l'interazione tra la proteina aldolasi C ed un nuovo putativo interattore, la proteina ciclina A. L'interazione di questa proteina con l'aldolasi C è emersa grazie all'ausilio di un *software* di bioinformatica, Ingenuity Pathways Analysis (IPA) che abbiamo utilizzato allo scopo di correlare i diversi putativi interattori molecolari di aldolasi C ottenuti dallo studio in lievito.

La proteina ciclina A è coinvolta in vari momenti del ciclo cellulare; il complesso ciclina A/Cdk2 è necessario per dare inizio alla replicazione. In cellule neuronali completamente differenziate i livelli di espressione di ciclina A risultano essere pari a zero. I precursori neuronali, successivamente a cicli di divisione e differenziamento passano dalla fase G1 ad una fase di quiescenza G0; nel raggiungere questa fase, i livelli di espressione di ciclina A si abbassano progressivamente fino ad azzerarsi una volta che la cellula risulta essere completamente differenziata.

L'intera sequenza codificante per la proteina ciclina A è stata clonata nel vettore di espressione procariotico pGEX e la proteina di fusione GST-ciclina A è stata utilizzata in esperimenti di *GST-pull-down*, analoghi a quelli descritti precedentemente, che hanno confermato l'interazione tra le 2 proteine ciclina A ed aldolasi C.

La dimostrazione dell'interazione tra aldolasi C ed NPDC1 costituiva una conferma dei dati ottenuti dalle analisi effettuate in lievito; per dare invece maggiore validità all'interazione tra aldolasi C e ciclina A erano necessarie ulteriori indagini. Abbiamo quindi allestito nuovi esperimenti di *GST-pull-down* utilizzando come esche le proteine GST-Aldolasi C *Full Length* (GST-Aldolasi C FL) e GST-Aldolasi C frammento C-terminale (GST-Aldolasi C Fr). Il frammento C-terminale della proteina aldolasi C di topo è quello utilizzato come esca nell'esperimento del doppio ibrido in lievito. Le proteine di fusione GST-Aldolasi C FL e GST-Aldolasi C Fr così ottenute, dopo essere state purificate, sono state cimentate con estratti proteici totali ottenuti da cervello di topo adulto e dalla linea cellulare Neuro2A. I complessi proteici sono stati separati su SDS-PAGE e trasferiti su filtri di nitrocellulosa; questi ultimi sono stati ibridati con un anticorpo monoclonale diretto contro la proteina ciclina A. I risultati ottenuti hanno confermato l'interazione tra le proteine aldolasi C e ciclina A. I

filtri di nitrocellulosa utilizzati per gli esperimenti di *Western Blot* sono stati in seguito ibridati con un anticorpo diretto contro la proteina NPDC1, ma non è stato possibile visualizzare bande immunoreattive corrispondenti alla proteina NPDC1. L'interazione tra aldolasi C e ciclina A è dunque indipendente da NPDC1.

Al fine di confermare le interazioni descritte mediante metodiche differenti dal *GST-pull-down* abbiamo effettuato esperimenti di co-immunoprecipitazione. Alcuni di questi esperimenti sono stati condotti immunoprecipitando l'aldolasi C endogena da estratti totali e frazionati (nucleo e citosol) dalla linea cellulare Neuro2A con un anticorpo anti-aldolasi C monoclonale. Il complesso multiproteico legato all'anticorpo è stato poi isolato utilizzando la proteina A-G sefarosio che lega efficacemente l'anticorpo. Altri esperimenti di co-immunoprecipitazione sono stati effettuati successivamente a trasfezione della linea cellulare Neuro2A con un vettore di espressione eucariotico, p3xFLAG, con all'interno clonata la sequenza codificante per la proteina aldolasi C *full lenght* di topo, a valle di un epitopo FLAG: la proteina così espressa avrà un epitopo FLAG ripetuto 3 volte all'estremità N-terminale. Per questo tipo di esperimenti è stata utilizzata una resina funzionalizzata con un anticorpo anti-FLAG. Gli esperimenti di co-immunoprecipitazione così descritti hanno confermato le interazioni tra l'aldolasi C ed NPDC1 e tra l'aldolasi C e la ciclina A.

In particolare, l'interazione della proteina aldolasi C con NPDC1 avviene nel nucleo mentre l'interazione tra aldolasi C e ciclina A avviene nel citoplasma delle cellule Neuro2A. Queste informazioni sono fondamentali dal punto di vista funzionale. La proteina NPDC1 svolge nel nucleo importanti funzioni regolatorie. Essa è infatti in grado di bloccare l'attivazione trascrizionale mediata da E2F1 su geni importanti per la progressione del ciclo cellulare e la proteina aldolasi C potrebbe avere un ruolo chiave in questo processo. La proteina ciclina A invece subisce, nel corso del differenziamento neuronale, una progressiva inattivazione; l'aldolasi C potrebbe essere in qualche modo coinvolta in questo processo.

La proteina aldolasi C, dunque interagisce con 2 proteine strettamente coinvolte nel differenziamento neuronale. Allo scopo di comprendere meglio il ruolo di aldolasi C in questi processi, abbiamo effettuato alcuni studi preliminari sulla linea cellulare PC12 che rappresenta uno dei modelli sperimentali maggiormente utilizzati per lo studio del differenziamento neuronale.

Recenti esperimenti di *real time* PCR, effettuati nel nostro laboratorio su RNA estratto da PC12 indotte al differenziamento neuronale con NGF, hanno dimostrato che il messaggero di aldolasi C aumenta progressivamente durante il differenziamento (trattamento con NGF effettuato in *time course* a partire dal tempo 0 fino a 14 giorni). Per osservare questo processo dal punto di vista proteico, abbiamo effettuato alcuni esperimenti preliminari di *Western Blot* su estratti citosolici ottenuti da cellule PC12, riproducendo il trattamento con NGF in *time course* fino a 3 giorni. Abbiamo notato che anche a livello proteico, si osserva un aumento dell'espressione della proteina aldolasi C nel corso del differenziamento neuronale. Analizzando gli stessi estratti citosolici abbiamo osservato che i livelli di espressione della proteina ciclina A si riducono nel corso del differenziamento. Infine abbiamo analizzato i livelli di espressione delle proteine fosforilate ERK 1 e 2, *marker* del differenziamento neuronale, ed abbiamo potuto osservare un progressivo aumento di espressione della proteina durante il differenziamento neuronale.

Non abbiamo potuto effettuare esperimenti simili valutando i livelli di espressione della proteina NPDC1 perché la proteina non risulta rilevabile per *Western Blot* nell'arco di tempo considerato, la sua espressione infatti, inizia nelle fasi molto tardive del differenziamento neuronale.

Per avere conferma che la proteina aldolasi C avesse effettivamente un ruolo nel differenziamento neuronale abbiamo trasfettato le cellule PC12, non indotte al differenziamento, con 1 µg e 4 µg del vettore di espressione p3xFLAG-aldolasi C, mimando l'aumento di aldolasi C che avviene nelle cellule indotte al differenziamento con NGF. Abbiamo dunque monitorato i livelli di espressione delle proteine ERK fosforilate a 1 e 3 giorni dalla trasfezione. Rispetto al controllo (cellule trasfettate con 4 µg del vettore vuoto) le proteine fosforilate ERK 1 e 2 aumentano in misura proporzionale alla quantità di costrutto trasfettato.

Allo scopo di capire l'effetto che l'aumento di aldolasi C ha sulla proteina ciclina A abbiamo osservato i livelli di espressione della proteina ciclina A in estratti citosolici da cellule trasfettate con 1 µg e 4 µg del vettore di espressione p3xFLAG-aldolasi C a 1 e 3 giorni dalla trasfezione. Abbiamo notato che è possibile osservare un aumento dei livelli di espressione della proteina ad 1 giorno dalla trasfezione, l'aumento è seguito a 3 giorni da una riduzione. Anche in questo caso l'effetto è proporzionale alla quantità di costrutto trasfettato. La riduzione dell'espressione della proteina ciclina A nel citosol è un evento che, come indicato in precedenza, avviene anche nel corso del differenziamento neuronale indotto da NGF in PC12.

Per ottenere un quadro della sub-localizzazione cellulare delle proteine aldolasi C e ciclina A, sono stati effettuati esperimenti di immunofluorescenza su cellule PC12 indotte al differenziamento neuronale con NGF. I risultati ottenuti dimostrano che la distribuzione delle 2 proteine varia in modo considerevole nei diversi momenti del differenziamento neuronale.

I risultati ottenuti portano a concludere che la proteina aldolasi C sia effettivamente coinvolta nei processi del differenziamento neuronale, e che potrebbe agire secondo due differenti meccanismi pro-differenziativi. In fase precoce di differenziamento neuronale, l'aldolasi C potrebbe avere un'azione inibitoria sulla fosforilazione della proteina ciclina A che dunque risulterebbe inattiva o potrebbe sequestrarla nel citosol. In fase tardiva, interagendo nel nucleo con NPDC1, l'aldolasi C potrebbe favorire l'azione di inibizione che NPDC1 opera su E2F1, fattore trascrizionale che controlla la trascrizione di geni importanti per la progressione del ciclo cellulare, tra cui anche ciclina A.

1. INTRODUZIONE:

1.1. Le aldolasi nei mammiferi

L'enzima "fruttosio 1,6 bisfosfato aldolasi", più comunemente noto come "aldolasi" è un enzima della via glicolitica appartenente alla classe delle liasi che catalizza la scissione del fruttosio 1,6 bisfosfato in gliceraldeide 3-fosfato e diidrossiacetone-fosfato (Fig. 1) (1,2):

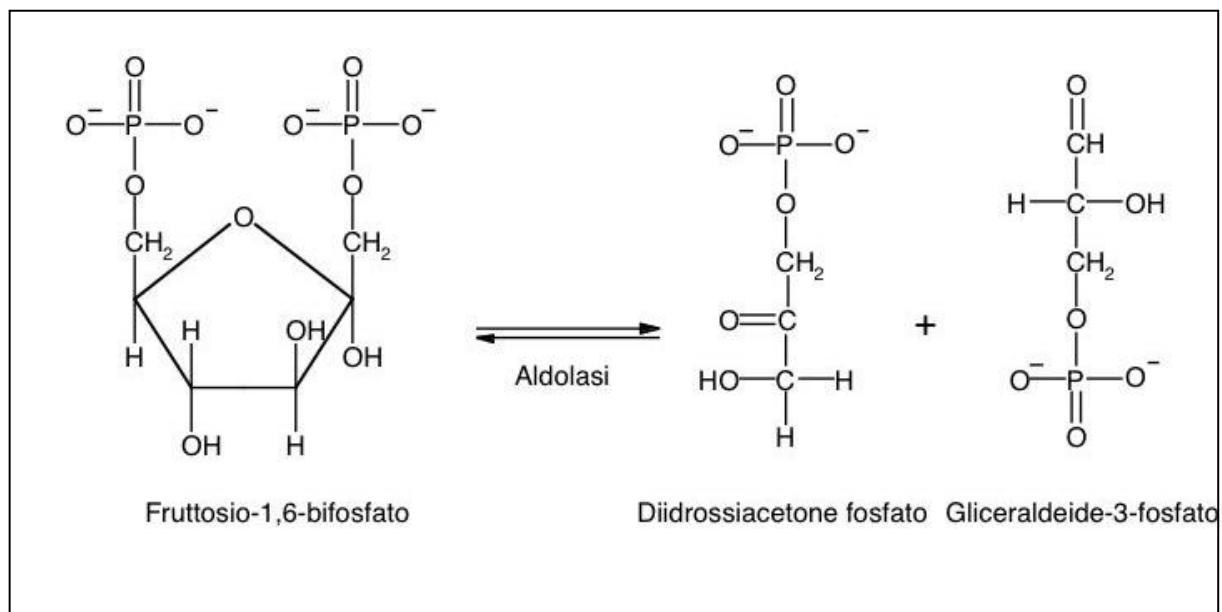


Figura 1: reazione catalizzata dall'enzima aldolasi

Tale reazione rappresenta il quarto *step* della glicolisi; l'aldolasi può catalizzare la reazione in entrambi i sensi. Il nome dell'enzima deriva infatti dalla reazione inversa, una condensazione aldolica.

In base al meccanismo di catalisi si distinguono 2 classi di aldolasi: le aldolasi di classe I, presenti nelle alghe verdi, nelle piante superiori e negli animali e quelle di classe II, diffuse tra i lieviti ed i procarioti. Le prime, omotetrameriche o eterotetrameriche, non richiedono cofattori per la catalisi che avviene mediante la formazione di una base di Schiff tra enzima e substrato. Le aldolasi di classe II, invece, sono dimeriche e poiché non formano la base di Schiff, necessitano per funzionare di cationi bivalenti come Fe²⁺ e Zn²⁺ (1,2).

Nei mammiferi l'aldolasi è presente sotto forma di 3 isoenzimi: aldolasi A, B e C codificati da 3 geni diversi. Nell'uomo i tre geni sono localizzati rispettivamente sui cromosomi 16, 9 e 17 (3-6). Tali geni derivano per duplicazione da un unico gene ancestrale e producono tre proteine distinte con notevole omologia di sequenza all'estremità N-terminale; l'estremità C-terminale differenzia invece le tre proteine conferendo ad esse specifiche proprietà catalitiche ed antigeniche (7,8).

Le identità di sequenza nucleotidiche ed amminoacidiche delle aldolasi nell'uomo sono riportate nella tabella 1 (1,2, 8-11):

Isoenzimi	Identità di sequenza nucleotidica	Identità di sequenza amminoacidica
Aldolasi A vs Aldolasi C	67%	78%
Aldolasi C vs Aldolasi B	63%	68%
Aldolasi A vs Aldolasi B	68%	66%

Tabella 1: identità di sequenza nucleotidica ed amminoacidica tra i vari isoenzimi di aldolasi

I residui amminoacidici costituenti il sito attivo (Asp33, Arg42, Lys107, Lys146, Glu187, Ser271, Arg303 e Lys229) (9) risultano conservati nei tre isoenzimi. Dall'analisi delle identità di sequenza a livello nucleotidico ed amminoacidico si deduce che il gene dell'aldolasi C si è evoluto a partire da quello dell'aldolasi A, dopo che i geni aldolasi A ed aldolasi B si sono diversificati (11).

Pur avendo meccanismi catalitici simili, i tre isoenzimi sono caratterizzati da differenti cinetiche e specificità verso i substrati fisiologici: fruttosio 1,6 bifosfato (FBP) e fruttosio 1 fosfato (F1P) (1,12): l'aldolasi A presenta una maggiore affinità verso il FBP che non verso il F1P ($FBP/F1P=50$) (10,11). L'aldolasi B ha uguale affinità per i due substrati FBP e F1P ($FBP/F1P=1$), ma principalmente provvede ad utilizzare il fruttosio esogeno dopo la sua fosforilazione a F1P ed è coinvolta nella gluconeogenesi (1,2). L'aldolasi C presenta una minore affinità per il substrato specifico FBP ($FBP/F1P=25$) (1,2).

I tre isoenzimi presentano inoltre una differente distribuzione tissutale: l'aldolasi A è distribuita in maniera ubiquitaria in tutti i tessuti compreso il sistema nervoso centrale (SNC); elevati livelli di espressione sono presenti nel muscolo scheletrico e negli eritrociti dove rappresenta l'unica isoforma presente (3). Mutazioni in questo gene sono associate ad anemia emolitica e miopatia (3,12,13). L'aldolasi B è principalmente espressa nel fegato adulto ed in minima parte anche nel rene e nel piccolo intestino (5). Mutazioni in questo gene sono causa dell'intolleranza ereditaria al fruttosio (5,14-17). L'aldolasi C è presente selettivamente in alcune aree nel SNC dei mammiferi adulti quali: l'ippocampo, le olive pontine e cerebellari, i nuclei talamici, il midollo allungato, il corpo striato e, a livello del cervelletto nello strato delle cellule del Purkinje. Ad oggi non sono note mutazioni nel gene dell'aldolasi associate a patologie. Le aldolasi A e C sono costitutivamente espresse mentre l'aldolasi B ha invece una espressione regolata dall'assunzione di fruttosio (2,5,7). L'espressione delle tre proteine è regolata nel corso dello sviluppo e del differenziamento nei mammiferi: nei tessuti fetali predomina l'aldolasi A insieme all'aldolasi C; dopo la nascita, l'aldolasi A resta espressa in tutti i tessuti ma tende a diminuire fino quasi a scomparire nel fegato, dove invece predomina l'aldolasi B; l'aldolasi C invece aumenta durante lo sviluppo nel SNC ed è massima nel cervelletto adulto (2,18). L'espressione dei tre isoenzimi è modificata in alcune condizioni patologiche: nell'epatocarcinoma di ratto si assiste ad un cambio del *pattern* fetale, con un

decremento della produzione di aldolasi B (l'isoenzima epato-specifico) ed un aumento della sintesi di aldolasi A e C (10,19).

1.2. Aldolasi C: organizzazione strutturale del gene nei mammiferi e comparazione tra le specie

Il gene dell'aldolasi C nei mammiferi è presente in singola copia per assetto aploide e nell'uomo è localizzato sul cromosoma 17 cen-q12 (10,20). È conservato tra le specie nel corso dell'evoluzione: presenta infatti un'organizzazione strutturale ed un'identità di sequenza comparabili nei mammiferi quali il topo, il ratto, il coniglio e l'uomo (2,10,11,20,21).

Il gene umano dell'aldolasi C è lungo 5198 nucleotidi ed è costituito da 9 esoni di cui 8 codificanti di lunghezza pari a 1092 basi. Tutti gli esoni di aldolasi C presentano lunghezza e posizioni conservate rispetto a quelle degli isoenzimi A e B e nell'esone IX è presente la sequenza consenso di poliadenilazione AATAAA posta a 390 basi a valle del codone di terminazione TGA. Il trascritto dell'esone I non è tradotto ed il primo tratto codificante è rappresentato dall'esone II che include 12 basi della regione 5' non codificante. Nei geni umani codificanti le tre aldolasi è conservata la posizione degli introni che però differiscono tra loro per lunghezza; infatti, nel gene dell'aldolasi C, gli introni sono più corti rispetto a quelli di aldolasi B ed A (20,21).

Il gene dell'aldolasi C nel ratto è situato sul cromosoma 10 e nel topo sul cromosoma 11. Sono entrambi costituiti dallo stesso numero di esoni dell'omologo gene umano; il primo esone non codificante risulta tuttavia essere di lunghezza differente.

Il gene dell'aldolasi C è conservato anche nei vertebrati dei gradini più bassi della scala evolutiva quali *Xenopus laevis*, *Lampreda*, *Goldfish*, e negli invertebrati quali *Caenorhabditis elegans* e *Drosophila melanogaster* (22-26).

In *Xenopus laevis* sono presenti tre distinti geni localizzati su cromosomi diversi. L'aldolasi C è espressa negli ovociti e negli stadi precoci dello sviluppo embrionale, mentre nell'animale adulto è espressa prevalentemente nel muscolo cardiaco e nel tessuto nervoso (22).

In *Lampreda* ci sono solo due distinti geni, codificanti per l'isoenzima di tipo muscolare e di tipo non-muscolare. Il tipo muscolare ha caratteristiche intermedie tra l'aldolasi A e C dei vertebrati superiori ed è espresso nel muscolo scheletrico, nel cuore e nel cervello, mentre il tipo non-muscolare, equivalente alla B, è espresso prevalentemente nel fegato (23).

In *Goldfish* è presente un gene indipendente per l'aldolasi C, che si esprime specificamente nel tessuto nervoso (24).

Nel nematode *Caenorhabditis elegans* sono presenti due differenti geni codificanti per due aldolasi, CE-1 e CE-2 ed il tipo CE-2 è simile all'aldolasi C dei vertebrati (25).

In *Drosophila melanogaster* è presente un unico gene, da cui derivano tre messaggeri differenti per *splicing* alternativo. La regione codificante è lunga circa 3.5

kb e consiste di cinque esoni, 2, 3, 4 α , 4 β , 4 γ . Dalla combinazione alternativa dell'esone 4 triplicato derivano tre mRNA che si esprimono in maniera differente: l'mRNA α è espresso in tutti gli stadi dello sviluppo ed è ubiquitario nello stadio adulto, il tipo β è espresso prevalentemente nelle strutture addominali del moscerino adulto, mentre il tipo γ si localizza nella regione della testa e nel torace (26).

La conservazione del gene codificante per aldolasi C nella scala evolutiva e la sua espressione ristretta a pochi tessuti avvalorano l'ipotesi di un suo ruolo nel differenziamento e nello sviluppo.

1.3. Analisi della distribuzione del messaggero e della proteina aldolasi C nel SNC dei mammiferi

Nell'uomo, l'RNA messaggero dell'aldolasi C ha una lunghezza di circa 1.75 Kb, e codifica per una proteina di 39.5 kDa (364 amminoacidi) (10,11). L'enzima può funzionare come un etero- o un omo-tetramero composto dai 3 tipi di monomeri diversi: A, B, C. Il peso complessivo del tetramero è di circa 160 kDa.

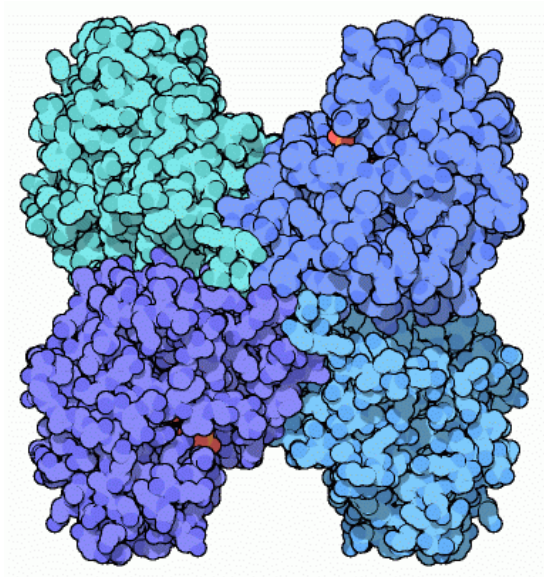


Figura 2: modello tridimensionale dell'enzima nella forma tetramericata

Studi differenti effettuati su cervello di topo e di ratto hanno dimostrato che nello strato delle cellule del Purkinje, sia il messaggero che la proteina aldolasi C si distribuiscono in maniera discontinua dando origine ad un motivo detto a "strisce" o a "zebra" da cui il nome di "zebrina II" (27-30). L'espressione a bande dell'aldolasi C nelle cellule del Purkinje nel cervelletto di topo è stata riportata per la prima volta in 2 pubblicazioni di Anh e Hawkes (29,31). L'espressione dell'aldolasi C è regolata durante lo sviluppo ed il differenziamento: nel topo il messaggero compare al 15° giorno dallo stadio embrionale (E15) in tutti i tessuti fetali. Dopo la nascita diminuisce

fino a scomparire in tutti i tessuti eccetto che nel cervello, dove raggiunge la massima espressione in età adulta (29).

Nel corso degli ultimi anni la proteina aldolasi C è diventata un *marker* per eccellenza negli studi topografici di compartimentalizzazione cerebellare (32,33). Essendo espressa solo in alcune delle cellule del Purkinje nel cervelletto, l'aldolasi C risulta essere distribuita in "strisce" parasagittali. Questa caratteristica distribuzione è stata evidenziata con alta riproducibilità in specie differenti (topo, ratto e uomo). Sebbene la corteccia cerebellare appaia istologicamente uniforme, essa è suddivisa rostro-caudalmente e medio-lateralmente in una complicata serie di zone orizzontali e strisce parasagittali (33-38). Tale suddivisione riflette fedelmente il *pattern* di connessioni afferenti ed efferenti che collegano il cervelletto con il resto del SNC (39,40).

Il cervelletto può essere suddiviso in 4 zone orizzontali in base alla differente espressione della proteina: la zona anteriore (AZ; lobuli I-V), la zona centrale (CZ; lobuli VI-VII), la zona posteriore (PZ; lobulo VIII – lobulo dorsale IX) e la zona nodulare (NZ; lobulo ventrale IX – lobulo X). (38,41,42). (Ciascuna zona orizzontale è ulteriormente suddivisa in "strisce" parasagittali).

L'aldolasi C è espressa a bande solo nelle porzioni AZ e PZ. Nelle cellule del Purkinje l'aldolasi C risulta essere espressa nelle zone da P1+ a P7+ (indicate nella figura 3 come 1-7) (43). Le aree intermedie (di colore chiaro in figura 3), in cui l'aldolasi C non è espressa sono numerate in riferimento alle bande vicine in cui aldolasi C è espressa. (Fig. 3) (29,43).

Nel topo, durante il corso dello sviluppo cerebrale, la proteina aldolasi C non è espressa fino al quinto giorno successivo alla nascita (P5). Dal giorno 5 al giorno 7 l'aldolasi è espressa solo nel lobo posteriore, dove sono evidenziabili cellule del Purkinje immunoreattive nei lobuli VIII, IX, X. Dal giorno 7 al giorno 12 la maggior parte delle cellule del Purkinje nel verme iniziano ad esprimere la proteina aldolasi C (30). Dal giorno 12 al giorno 15 l'aldolasi C compare anche negli emisferi e quasi tutte le cellule del Purkinje la esprimono ad alti livelli. Infine, dal giorno 15 al giorno 25 l'aldolasi C gradualmente scompare da quelle cellule del Purkinje che nell'adulto non esprimeranno la proteina, il processo va avanti finché il *pattern* maturo non viene raggiunto nei lobuli I-V e VIII-IX (AZ e PZ) (44,45).

Recentemente, il nostro gruppo di ricerca ha analizzato la differente espressione dei messaggeri e delle proteine aldolasi C e aldolasi A nel cervello umano, ricostruendo una mappa dettagliata dell'espressione delle proteine aldolasi A e C e della distribuzione dei loro relativi messaggeri in diverse aree del cervello e del cervelletto umano (46,47).

Da questi lavori è risultato evidente che nel SNC umano l'mRNA dell' aldolasi A, a differenza di quello dell'aldolasi C, è fortemente espresso in tutte le aree. La proteina aldolasi A è espressa nei neuroni del giro sovraorbitale, nei neuroni del lobo frontale e dei lobi temporali, nel citoplasma dei neuroni piramidali vicini al solco di Rolando. In tutte queste aree la proteina aldolasi C risulta essere assente. L'aldolasi A è espressa nei neuroni delle olive cerebrali e cerebellari superiori ed inferiori mentre l'aldolasi C è espressa solo nelle olive pontine e cerebellari inferiori dove risulta essere espressa a bande. Nello strato delle cellule del Purkinje del cervelletto la proteina aldolasi A è espressa ovunque a bassi livelli, come mostrato in figura 4A; in

questo distretto la proteina aldolasi C risulta raggiungere la massima espressione con la tipica distribuzione a bande evidenziata anche nel ratto e nel topo. L'espressione a bande dell'aldolasi C è stata riscontrata non solo nelle cellule del Purkinje nel cervelletto (Fig4, B-D), ma anche nelle olive inferiori e nei nuclei di Goll e Burdach nelle corna posteriori del midollo spinale (46,47).

La peculiare distribuzione a bande dell'aldolasi C in aree specifiche del SNC nelle quali l'aldolasi A risulta essere co-espressa, è a supporto dell'ipotesi che essa possa avere funzioni aggiuntive oltre al suo ruolo nei processi glicolitici.

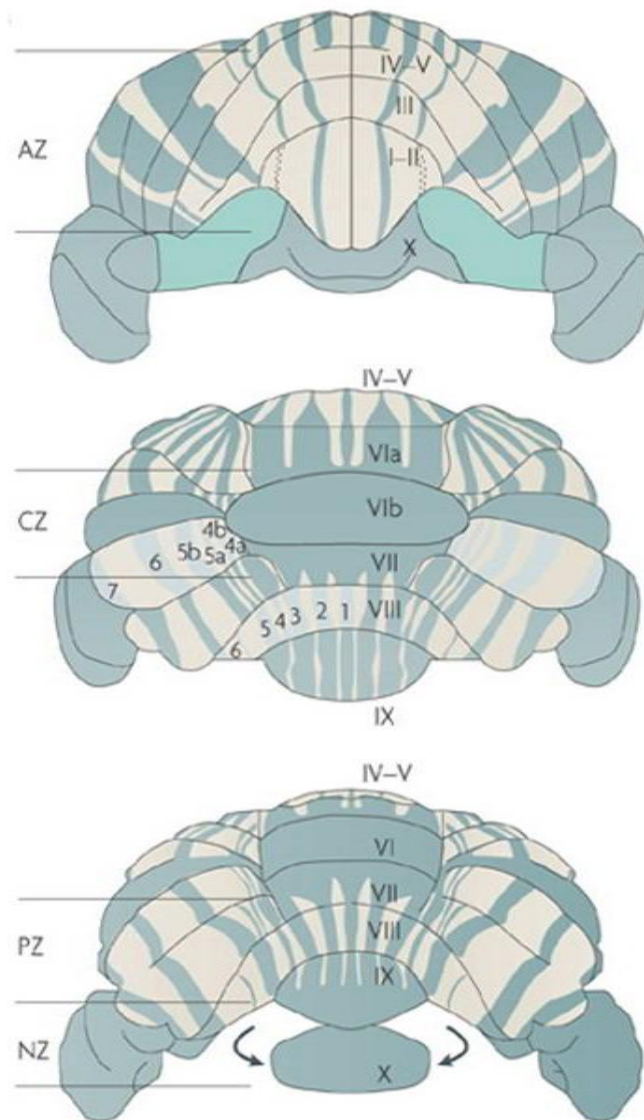


Figura 3: espressione dell'aldolasi C nella corteccia cerebellare di ratto

La corteccia cerebellare di topo è suddivisa in zone orizzontali e ciascuna zona è suddivisa in bande parasagittali. Zone e bande evidenziano il *pattern* di espressione della proteina aldolasi C.

La distribuzione delle cellule del Purkinje immunoreattive all'aldolasi C vista dal davanti (figura in alto), dall'alto (figura centrale) e da dietro (figura in basso) rivela una citoarchitettura complessa che comprende 4 zone orizzontali nel verme ed in entrambi gli emisferi: la zona a bande anteriore (AZ) e la zona posteriore (PZ) si alternano con la zona centrale (CZ) uniformemente immunoreattiva all'aldolasi C e la zona nodulare (NZ). Le bande di cellule del Purkinje immunoreattiva per Aldolasi C sono le aree da P1+ a P7+ lateralmente dalla linea mediana, e le bande negative intermedie (rappresentata in colore chiaro in figura) sono numerate in riferimento alle bande positive vicine ad esse. I lobuli sono indicati in numeri romani.

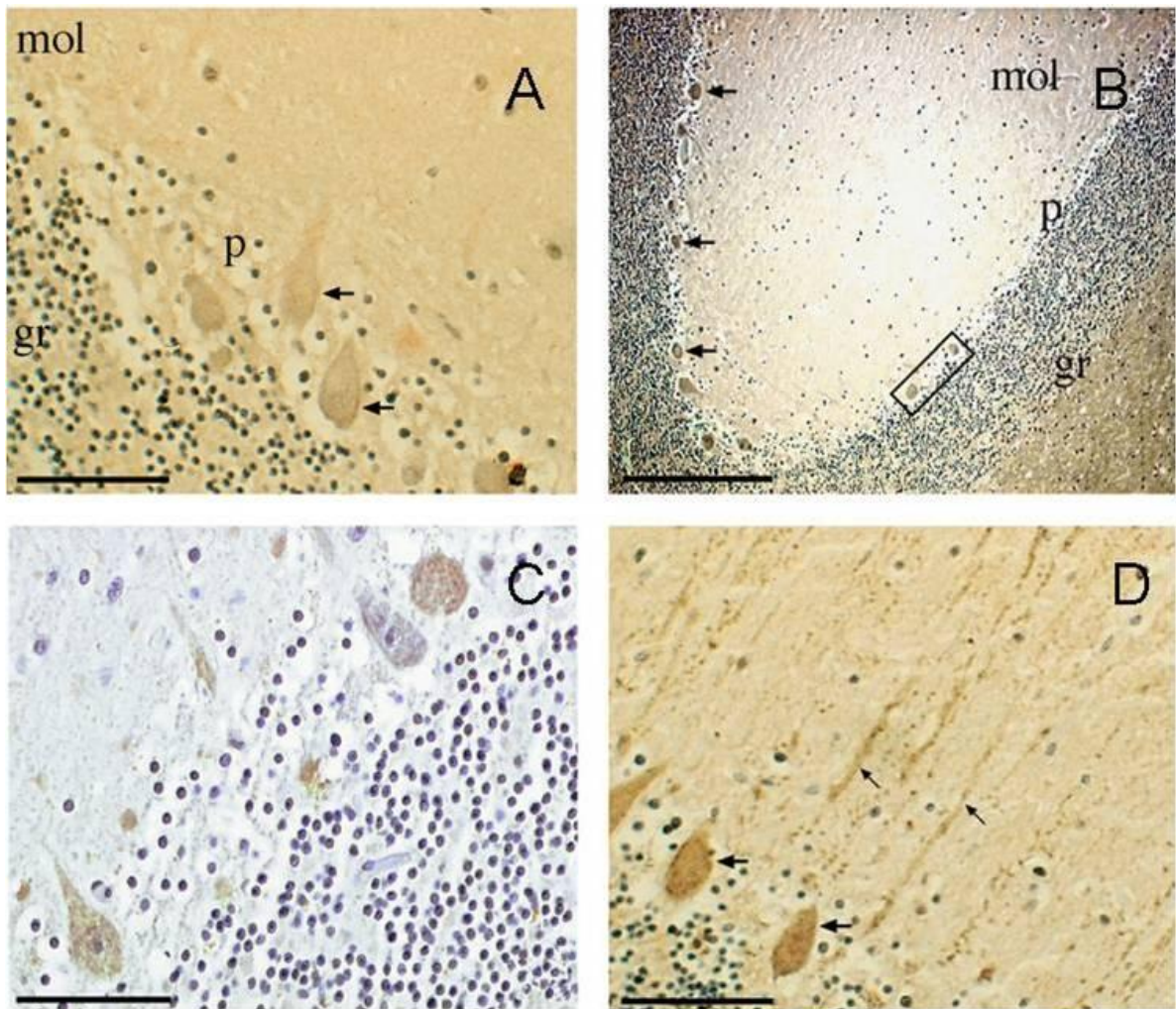


Figura 4: sezioni coronali di corteccia cerebellare anteriore umana ibridate con anticorpi anti-aldolasi A ed anti-aldolasi C e contrastate con ematossilina (46)

Nel pannello A è mostrata una sezione di corteccia cerebellare umana ibridata con l'anticorpo anti-aldolasi A: la proteina è espressa a bassi livelli nelle cellule del Purkinje indicate dalla freccia.

Nel pannello B è mostrata una sezione di corteccia cerebellare umana ibridata con l'anticorpo anti-aldolasi C: sono evidenti cellule del Purkinje positive per aldolasi C indicate con le frecce alternate a cellule aldolasi C-negative.

Il pannello C rappresenta un ingrandimento della *box* riportata in B e mostra una cellula del Purkinje aldolasi C-negativa compresa tra due cellule positive per aldolasi C.

Nel pannello D infine si può apprezzare meglio la localizzazione della proteina aldolasi C nel citoplasma delle cellule del Purkinje (frecce grandi) e nei dendriti che da essa si dipartono (frecce piccole).

mol, p e gr indicano rispettivamente lo strato molecolare, le cellule del Purkinje e lo strato granulare.

Barre: (A), (C) e (D) 100 μ m; (B) 500 μ m

1.4. Identificazione di putativi interattori molecolari di aldolasi C

Da diversi anni il gruppo di ricerca nel quale ho svolto la mia attività di tesi studia con approcci multidisciplinari la regolazione trascrizionale ed il ruolo funzionale della proteina aldolasi C nel SNC dei mammiferi. In particolare i vari progetti sono volti all'analisi dell'espressione del gene umano aldolasi C durante il differenziamento neuronale sia *in vitro* che *in vivo*, alla generazione di topi *knock-out* per il gene aldolasi C ed alla ricerca dei *partners* molecolari della proteina.

Nel contesto di quest'ultima linea di ricerca sono stati individuati alcuni putativi interattori molecolari diretti di aldolasi C *in vivo* mediante la tecnica del *two-hybrid* assay in lievito utilizzando il frammento C-terminale dell'aldolasi C murina (35 aminoacidi) caratteristico di questo isoenzima quale "sonda" per analizzare, in lievito, una libreria di cDNA di cervello di topo.

L'analisi ha permesso di individuare 60 putativi interattori della proteina aldolasi C. Sulla base di informazioni riguardanti la localizzazione, l'espressione e la distribuzione delle proteine individuate, sono state selezionate 6 proteine (elencate in tabella 2) per le quali si è passati alla validazione dell'interazione con aldolasi C mediante differenti tecniche.

Atassina 10
Enolasi γ
Paralemmina
<i>Heat Shock Protein 40</i> (HSP40)
<i>Kv Channel interacting protein 1</i> (Kcni1)
<i>Neural Proliferation Differentiation and Control 1</i> (NPDC1)

Tabella 2: putativi interattori diretti di aldolasi C nel SNC di topo

L'atassina 10, prodotto del gene SCA10, è una proteina di 55 kDa che appartiene alla famiglia di proteine "Armadiillo repeat" ed è molto espressa nel cervello (48). Esperimenti di immunistochemica su sezioni di cervello di topo e uomo hanno rivelato che la proteina è prevalentemente localizzata nel citoplasma e nella zona perinucleare dei neuroni olivo-cerebellari. In cellule primarie neuronali, la ridotta espressione di atassina 10 ottenuta mediante l'utilizzo di *small interfering RNA*, risulta in una aumentata apoptosi dei neuroni (49,50). L'atassina 10 è coinvolta in una grave patologia neurodegenerativa, l'atassia spinocerebellare di tipo 10. La mutazione genetica causa della malattia è una grande espansione (fino a 2.5 Kb) del pentanucleotide ATTCT all'interno del nono introne del gene SCA10 localizzato sul cromosoma 22q13.31 (51). Nel nostro laboratorio sono stati condotti esperimenti di *GST-pull-down* e di co-immunoprecipitazione su estratti proteici totali da cervello di

topo e dalla linea cellulare di neuroblastoma di topo (Neuro2A). Gli esperimenti hanno confermato l'interazione tra l'atassina 10 e l'aldolasi C.

L'enolasi γ è l'isoenzima neuronale dell'enolasi, enzima coinvolto nel metabolismo del glucosio che catalizza la conversione del 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato. E' considerato un *marker* di differenziamento neuronale, aumenta infatti in cellule staminali mesenchimali umane dopo trattamento con acido retinoico ed in linee cellulari di neuroblastoma umano indotte al differenziamento con *Nerve Grow Factor* (NGF) (52-53).

La paralemmina è una proteina associata alla membrana plasmatica dei neuroni, implicata nei processi di formazione cellulare e probabilmente di trasporto vescicolare; è espressa prevalentemente nel cervello ed è un potente modulatore del *signaling* del cAMP (54).

L'HSP 40 è una proteina costitutivamente espressa nel cervello dei mammiferi ed il suo ruolo fondamentale è quello di regolare l'attività delle chaperonine (55).

La proteina KCNIP1, membro della superfamiglia di proteine neuronali leganti il calcio, è associata ai canali del potassio Kv4 e ne modula l'attività ed il *trafficking* (56,57). KCNIP1 è prevalentemente espressa in una sottopopolazione di neuroni ampiamente distribuiti nel cervello, è inoltre espressa nelle cellule del Purkinje nel cervelletto. Secondo alcuni studi potrebbe avere un ruolo fondamentale nella neurotrasmissione inibitoria GABAergica (58).

I successivi due paragrafi sono dedicati a due proteine su cui in questi anni abbiamo concentrato la maggior parte del lavoro: la proteina NPDC1, putativo interattore diretto dell'aldolasi C risultato dalle analisi effettuate in lievito e la proteina ciclina A, la cui interazione con l'aldolasi C è stata ipotizzata nel corso del dottorato.

1.4.1. NPDC1: Neural Proliferation Differentiation and Control 1

NPDC1 è una proteina espressa principalmente nel SNC ed è coinvolta nella complessa regolazione della proliferazione e del differenziamento neuronale. È composta da 332 amminoacidi, ha un peso molecolare di 34 kDa e possiede un tratto transmembrana (aa 191-211) (59,60). Il gene umano hNPDC1 è situato sul cromosoma 9q34.3, è costituito da 9 esoni e mostra notevole identità di sequenza (71,7%) con il gene omologo murino. L'mRNA di NPDC1 nell'uomo e nel topo è selettivamente espresso in aree specifiche del SNC come il giro dentato dell'ippocampo, il lobo frontale, il lobo parietale e le cellule del Purkinje nel cervelletto (61); nell'uomo la proteina è espressa anche nella prostata, nella ghiandola pituitaria e nelle ghiandole mammarie, e ciò suggerisce che possa essere implicata anche nello sviluppo di ghiandole secernenti (60).

Studi di ibridazione *in situ* hanno dimostrato che l'mRNA di NPDC1 aumenta nelle cellule neuronali quando queste smettono di dividersi ed iniziano a differenziare (61). Saggi di immunoistochimica ed immunofluorescenza rivelano che NPDC1 viene trasportata in vescicole sinaptiche dall'apparato di Golgi alla membrana cellulare dove probabilmente viene internalizzata in endosomi (62). La proteina co-localizza

con le proteine delle vescicole sinaptiche sinaptofisina, sinaptobrevina-2 e Rab-3 GEP (62,63).

Studi condotti sia *in vitro* che *in vivo* indicano che NPDC1 è in grado di interagire con il fattore di trascrizione E2F-1 e con una varietà di proteine regolatorie coinvolte nel ciclo cellulare quali ciclina D, ciclina A, chinasi ciclina-dipendente di tipo 2 (cdk2), regolando in tal modo il differenziamento dei precursori neuronali (61,64). L'associazione di NPDC1 al fattore trascrizionale E2F-1 inibisce il legame di quest'ultimo al DNA bloccando in questo modo gli eventi trascrizionali da esso regolati. L'azione inibitoria di NPDC1 su E2F-1 si realizza anche attraverso il legame al suo promotore (64). Il fattore trascrizionale E2F-1 è uno dei principali *target* della regolazione del ciclo cellulare; membro della famiglia E2F, gioca un ruolo centrale nella transizione dalla fase G1 alla fase S nel ciclo cellulare dei mammiferi, attiva la trascrizione di cicline, di chinasi-cicline dipendenti (regolatori dei *checkpoint* del ciclo cellulare) e di proteine coinvolte nella riparazione e replicazione del DNA (65,66). Pertanto, l'azione inibitoria di NPDC1 sul fattore trascrizionale E2F-1 ha importanti ripercussioni sul ciclo cellulare.

È stato evidenziato che la proteina NPDC1 presenta domini HLH-simili, tipici di fattori anti-proliferativi e possiede diverse similitudini con la proteina necdin, implicata a sua volta nella inibizione della proliferazione dei precursori neuronali (64). Alcuni autori hanno dimostrato che NPDC1, se trasfettata in linee cellulari tumorali, anche di origine non neuronale, è in grado di sopprimere la trasformazione neoplastica (59). Inoltre, essa va incontro ad un rapido *turnover* e la sua degradazione è ubiquitina/proteasoma dipendente; in particolare, la fosforilazione della sequenza PEST (sequenza ricca in prolina, acido glutammico, serina e treonina) localizzata all'estremità carbossi-terminale sembra essere necessaria per la sua degradazione (67).

Il topo *knock-out* per il gene NPDC1 non presenta anomalie né nello sviluppo embrionale, né nel fenotipo adulto (63).

In definitiva, quel che emerge dall'analisi dei dati riportati in letteratura è che NPDC1 *down-regola* la proliferazione di precursori neuronali, è capace di sopprimere la trasformazione oncogenica ed è coinvolta nella differenziazione terminale di cellule neuronali e gliali.

1.4.2. Ciclina A: ruolo nel ciclo cellulare e nel differenziamento

Le cicline sono una famiglia di proteine che controllano la progressione del ciclo cellulare attivando le proteine chinasi ciclina-dipendenti (Cdk) (68). Sono state così chiamate poiché la loro concentrazione varia in maniera ciclica durante il ciclo cellulare (Fig.5). Tuttora le cicline sono classificate in base alla struttura *cyclin-box*, conservata in ciascuna proteina di questa famiglia durante il ciclo cellulare (non tutte le cicline variano i livelli di espressione durante il ciclo cellulare) (69). La fluttuazione dell'espressione genica delle cicline e la loro degradazione proteolitica inducono oscillazioni nell'attività delle proteine Cdk e quindi nella progressione del ciclo cellulare. Le cicline formano complessi con le Cdk le quali iniziano ad attivarsi, ma

per una completa attivazione è necessario che il complesso venga fosforilato (69). Le cicline, da sole, non hanno attività enzimatica ma quando si trovano legate alle Cdk (come cdc2, cdk1 o cdk2) formano il “*maturing-promoting factor*” (MPF) che attiva altre proteine mediante fosforilazione. Queste proteine fosforilate sono a loro volta responsabili di eventi specifici durante il ciclo cellulare come la formazione di microtubuli ed il rimodellamento della cromatina. Le cicline possono essere divise in 4 classi in base al loro comportamento nel ciclo cellulare delle cellule dei vertebrati e dei lieviti: cicline G1/S, cicline S, cicline M e cicline G1. Tale classificazione è utile in generale ma non è da considerarsi come universale in quanto alcune cicline hanno funzioni diverse in diversi momenti del ciclo cellulare o in diversi tipi cellulari (68).

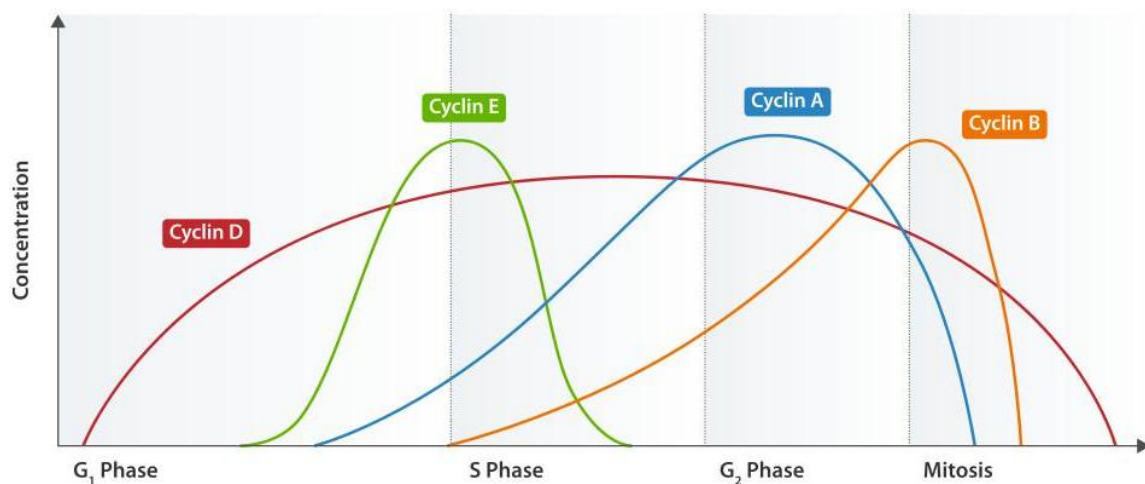


Figura 5: espressione delle varie cicline in diversi momenti del ciclo cellulare (70)

La ciclina A, come possiamo vedere in figura 5 è coinvolta in vari momenti del ciclo cellulare, nella transizione G₁/S e nella transizione G₂/M. (71) La proteina, costituita da 432 amminoacidi, nei mammiferi è espressa in 2 isoforme, la ciclina A1 e la ciclina A2. La prima è presente solo a livello della linea germinale maschile mentre la seconda (a cui nella tesi farò riferimento come ciclina A) è ampiamente espressa sia nelle cellule germinali che nei tessuti somatici (72-74).

Da alcuni studi è risultato evidente che l'aumentata espressione di ciclina A accelera l'ingresso delle cellule in fase S e ciò indica che questa ciclina rappresenta un fattore limitante necessario per dare inizio alla replicazione (75). Al contrario, microiniezioni di anticorpi diretti contro la proteina o l'utilizzo di RNA antisense in cellule in fase G₁ ne impedisce l'ingresso in fase S (76) ed in fase M (71).

E' stato dunque proposto che il complesso ciclina A/Cdk2 sia necessario per dare inizio alla replicazione, per l'attivazione di complessi replicativi pre-esistenti ed è un sistema di controllo per impedire una repentina seconda duplicazione cellulare (77-79). Inoltre il topo *knock out* per ciclina A muore durante la prime fasi dell'embriogenesi e ciò suggerisce che la ciclina A sia un gene essenziale (73).

Microiniezioni di ciclina A/Cdk2 ricombinanti in cellule umane in G2 velocizzano il processo di inizio della mitosi (80). Terminato il suo compito, la proteina viene degradata mediante l'*"anaphase promoting complex"* (81). Sebbene la sua localizzazione sia prevalentemente nucleare, il complesso ciclina A/Cdk2 è in grado di fosforilare substrati nucleari e citosolici (82) e la proteina Cdk2 è necessaria per il trasporto del complesso al nucleo (83).

In cellule neuronali completamente differenziate i livelli di espressione di ciclina A risultano essere pari a zero. I precursori neuronali, successivamente a cicli di divisione e differenziamento passano dalla fase G1 ad una fase di quiescenza G0; i livelli di espressione di ciclina A si abbassano progressivamente fino ad azzerarsi una volta che la cellula risulta essere completamente differenziata (68). L'uscita del ciclo cellulare rappresenta uno *step* necessario per dare inizio alla differenziazione ed iniziare un nuovo programma di espressione genica (84,85); si ritiene infatti che la mitosi terminale e la differenziazione finale siano due processi intimamente accoppiati (68).

2. SCOPO DELLA TESI

La proteina aldolasi C risulta essere nota per i processi glicolitici, tuttavia sono molte le informazioni che inducono a pensare che essa possa avere delle funzioni in processi ben distinti dalla glicolisi. La localizzazione della proteina aldolasi C in specifiche aree del SNC dove è espressa anche l'aldolasi A, unita alla sua peculiare distribuzione "a bande" nello strato delle cellule del Purkinje nel cervelletto, suggerisce che essa possa esplicare un'attività "*moonlight*". Studi recenti porterebbero ad ipotizzare un suo coinvolgimento nella trasmissione sensoriale, nello sviluppo cerebrale o nel differenziamento neuronale.

Lo scopo del mio progetto di ricerca è stato quindi quello di delucidare le funzioni non note di questo enzima attraverso lo studio di alcuni interattori di questa proteina precedentemente identificati mediante la tecnica del doppio ibrido da una libreria di cDNA ottenuta da cervello di topo.

In particolare, durante il mio dottorato mi sono occupato della caratterizzazione di due interattori: la proteina NPDC1, e la proteina ciclina A, la cui interazione con aldolasi C è stata evidenziata in corso d'opera. Mi sono inoltre occupato di valutare come varia l'espressione e la localizzazione sub-cellulare delle proteine aldolasi C e ciclina A nel corso del differenziamento neuronale indotto da NGF nella linea cellulare di feocromocitoma di ratto (PC12).

3. MATERIALI E METODI

3.1. Colture cellulari

La linea cellulare di neuroblastoma di topo (Neuro2A) è stata tenuta in coltura in piastre “Falcon” per colture cellulari, da 100 mm Ø in mezzo *Dulbecco’s Modified Eagle Medium* (DMEM) supplementato con il 10% di *Fetal Bovin Serum* (FBS) e con l’1% di una miscela di antibiotici (Pennicillina/Streptomicina). Le cellule sono state mantenute subconfluenti ed in attiva proliferazione.

La linea cellulare di feocromocitoma di ratto (PC12) è stata tenuta in coltura in piastre “Sarstedt” per colture cellulari, da 100 mm Ø ed in “Multiwell Sarstedt” da 2,5 mm Ø in mezzo *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) supplementato con il 10% di *Horse Serum* (HS), 5% *Fetal Bovin Serum* (FBS) e con l’1% di una miscela di antibiotici (Pennicillina/Streptomicina). Le cellule sono state mantenute subconfluenti ed in attiva proliferazione. Per il differenziamento sono stati aggiunti al mezzo di coltura 100 ng/ml di *Nerve Growth Factor* (NGF); le cellule sono state raccolte in diversi momenti successivi al trattamento (dopo: 2 ore, 1 e 3 giorni).

Entrambe le linee cellulari sono state tenute in coltura in un incubatore termostato a 37°C, con un’umidità relativa controllata ed il 5% di CO₂ necessaria per mantenere costante il pH del mezzo.

3.2. Costrutti utilizzati e metodiche di clonaggio

Per gli esperimenti di *GST-pull-down* sono stati utilizzati i seguenti costrutti:

- pGEX - aldolasi C *full lenght* (l’intera sequenza codificante per l’aldolasi C murina)
- pGEX - aldolasi C frammento (la sequenza codificante per 34 aa della porzione C-terminale dell’aldolasi C murina)
- pGEX - NPDC1 frammento (la sequenza codificante per 222 aa della porzione C-terminale di NPDC1 murino)
- pGEX - CCNA2 *full lenght* (l’intera sequenza codificante per la ciclina A murina)

Per gli esperimenti di trasfezione transiente nelle linee cellulari Neuro2A e PC12 sono stati utilizzati i seguenti costrutti:

- p3xFLAG - aldolasi C *full lenght* (l’intera sequenza codificante per l’aldolasi C murina)
- p3xFLAG NPDC1 *full lenght* (l’intera sequenza codificante per NPDC1 murino)

Per tutti i costrutti, i clonaggi sono stati effettuati come riportato di seguito ad eccezione dei costrutti contenenti le porzioni C-terminali di aldolasi C e NPDC1, le

cui sequenze codificanti erano state già precedentemente clonate rispettivamente nei vettori: pGBKT7 e pACT2.

- Le estrazioni di RNA dalla linea cellulare Neuro2A sono state effettuate utilizzando il kit: “*illustra RNAspin Mini RNA Isolation*” “GE Healthcare” secondo le istruzioni fornite dalla ditta.
- Le RT-PCR sono state effettuate utilizzando la trascrittasi inversa “*SuperScript III*” “Invitrogen” secondo le istruzioni fornite dalla ditta.
- Le PCR sono state condotte utilizzando la Taq polimerasi “*Expand High Fidelity PCR System*” “Roche” secondo le istruzioni fornite dalla ditta ed utilizzando il protocollo indicato in tabella 3:

1 ciclo	94°C	2 min
35 cicli	94°C	30 sec
	56°C	40 sec
	72°C	1 min/Kb
1 ciclo	72°C	7 min

Tabella 3: programma di PCR utilizzato

- Per le reazioni di PCR abbiamo utilizzato gli oligonucleotidi elencati in seguito. In ciascuna sequenza oligonucleotidica sono inseriti i siti di taglio per gli enzimi di restrizione utilizzati nei vari clonaggi, preceduti da una piccola porzione che consente il legame dell'enzima di restrizione al DNA. Negli schemi i siti di taglio sono indicati con un carattere colorato ed i relativi enzimi di restrizione utilizzati sono indicati in basso a ciascuno schema nello stesso colore del sito di taglio. Sono inoltre indicate le lunghezze dei vari oligonucleotidi e le loro temperature di *melting* (T_m).

Aldolasi C *full lenght* clonato in pGEX:

Oligo fw: ACGC**GTCTGAC**GTCATCATGCCCCACTCA
(28 bp) T_m: 56°C

Oligo rv: AAGGAAAAAA**GCGGCCGCG**TCAGCGTGCCTCAGTAG
(36 bp) T_m: 58°C

Sal I – **Not I**

Aldolasi C full lenght clonato in p3xFLAG:

Oligo fw: GG**GGTACCT**GTGCATCATGCCCCACTC
(26 bp) Tm: 56°C

Oligo rv: TGCT**TCTAGAG**TCAGCGTGCCTCAGTAG
(27 bp) Tm: 58°C

Kpn I – **Xba I**

Ciclina A full lenght clonato in pGEX:

Oligo fw: GCCG**GAATTC**ATGCCGGGCACCTCGAGG
(18 bp) Tm: 62°C

Oligo rv: GCCG**GTCTGAC**ACAGCATGGACTCCGAGCG
(19bp) Tm: 62°C

Eco RI – **Sal I**

NPDC1 full lenght clonato in pGEX:

Oligo fw: GCCG**GAATTC**ATGGCGACGCCCGTCCC
(17bp) Tm: 60°C

Oligo rv: GCCG**GTCTGACT**CACAATGCTGCTCTTTTCC
(20bp) Tm: 58°C

Eco RI – **Sal I**

Gli oligonucleotidi sono stati disegnati utilizzando il programma oligo 4, le reazioni di digestione sono state effettuate utilizzando enzimi di restrizione “Roche” precedentemente indicati secondo le istruzioni fornite dalla ditta (per il clonaggio dei frammenti di aldolasi C e NPDC1 sono stati utilizzati come enzimi di restrizione Eco RI e Xho I). Le reazioni di ligazione sono state effettuate utilizzando l’enzima DNA ligasi T4 “Promega”. Per le trasformazioni abbiamo utilizzato cellule di *E. coli* del tipo “Top 10” “Invitrogen”, chimicamente competenti. Come terreno di coltura per i batteri abbiamo utilizzato il terreno LB (Luria Bertani) sia solido che liquido con ampicillina “Sigma” (100mg/ml). Per le mini preparazioni di DNA plasmidico abbiamo utilizzato il kit: “illustra plasmidPrep Mini Spin Kit” della “GE Healthcare”, per le maxi preparazioni di DNA abbiamo utilizzato il kit: “Plasmid/Cosmid purification kit” della

“Quiagen”, secondo le istruzioni fornite dalle ditte. Il servizio di sintesi degli oligonucleotidi e di sequenziamento del DNA plasmidico è stato operato dal “CEINGE” (*Biotechnologie Avanzate S.C.ar.l., Napoli, Italia*).

3.3. Trasfezioni transienti

Le trasfezioni transienti sono state eseguite utilizzando la “*Lipofectamina 2000*” “*Invitrogen*” seguendo le istruzioni fornite dalla ditta. Per le trasfezioni in Neuro2A abbiamo utilizzato 4 µg di DNA plasmidico, per le trasfezioni in PC12 abbiamo utilizzato 1 µg o 4 µg di DNA plasmidico. Le Neuro2A sono state raccolte 48 ore dopo la trasfezione, mentre le PC12, a 2 ore, ad 1 giorno, e a 3 giorni dalla trasfezione. Come controllo negativo entrambe le linee cellulari sono state trasfettate con 4 µg di vettore p3xFLAG vuoto.

3.4. Estratti proteici totali

Le cellule sono state raccolte in *Phosphate buffered Saline* (PBS) e centrifugate a 1000 rpm per 10'. Il *pellet* è stato risospeso in un *buffer* di lisi (50 mM TRIS pH 8, 150 mM NaCl, 10% Glicerolo, 1 mM EDTA, 0,1% NP-40, 0,5 mM PMSF, 1:100 “*Protease Inhibitor Coctail*” “*Roche*”). Sono stati utilizzati 100 µl di *buffer* per ciascuna piastra da 100 mm Ø, la sospensione cellulare è stata tenuta in ghiaccio per 30' e rimescolata per inversione ogni 5'. Dopo la lisi in ghiaccio, il lisato è stato chiarificato centrifugando a 10000 rpm per 30' a 4°C. Il sovrantante, contenente le proteine cellulari solubili è stato recuperato, aliquotato e conservato a -80°C. Lo stesso protocollo è stato utilizzato per ottenere estratti proteici da cervello e fegato di topo adulto dopo l'omogeneizzazione del tessuto. La concentrazione degli estratti è stata determinata allo spettrofotometro mediante il “*Biorad Protein Assay*”.

3.5. Estratti proteici frazionati

Le cellule sono state raccolte in PBS e centrifugate a 1000 rpm per 10'. Il *pellet* è stato risospeso nel *buffer* di lisi 1 (10 mM Hepes, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,1 mM EGTA, 0,5 mM PMSF, 0,1 mM DTT 1:100 “*Protease Inhibitor Coctail*” “*Roche*”). Sono stati utilizzati 80 µl di *buffer* per ciascuna piastra da 100 mm Ø, la sospensione cellulare è stata tenuta in ghiaccio per 30' e rimescolata per inversione ogni 5'. Al fine di rompere meccanicamente le membrane cellulari, la sospensione è stata fatta passare attraverso un ago di una siringa da insulina da 1 ml per 10 volte. Il campione è stato centrifugato per 1' a 14000 rpm a 4°C, ed il surnatante (estratto proteico della frazione citosolica) aliquotato e conservato a -80°C. Il *pellet* è stato lavato 2 volte nel *buffer* di lisi 1 e centrifugato, al fine di allontanare le proteine citosoliche rimanenti. Il *pellet* è stato successivamente risospeso nel *buffer* di lisi 2 (10 mM Hepes, 400 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,1 mM EGTA, 0,5 mM PMSF, 5% Glicerolo, 0,1 mM DTT,

1:100 “*Protease Inhibitor Cocktail*” “Roche”). Sono stati utilizzati 40 µl di *buffer* per ciascuna piastra da 100 mm Ø, la sospensione cellulare è stata tenuta in ghiaccio per 30' e rimescolata per inversione ogni 5'. Il campione è stato centrifugato per 1' a 14000 rpm a 4°C ed il surnatante (estratto proteico della frazione nucleare) è stato aliquotato e conservato a -80°C. La concentrazione degli estratti è stata determinata allo spettrofotometro mediante il “Biorad *Protein Assay*”.

3.6. GST-pull-down

- Produzione delle proteine ricombinanti in batteri

Le sequenze codificanti per le proteine aldolasi C, ciclina A e per i frammenti c-terminali delle proteine aldolasi C e NPDC1 (utilizzati per l'analisi del doppio ibrido in lievito) sono state clonate nel vettore d'espressione procariotico pGEX (Fig. 6). Questo vettore consente di clonare il cDNA codificante per la proteina di interesse a valle della sequenza codificante per la proteina ricombinante *glutathione S-transferase* (GST).

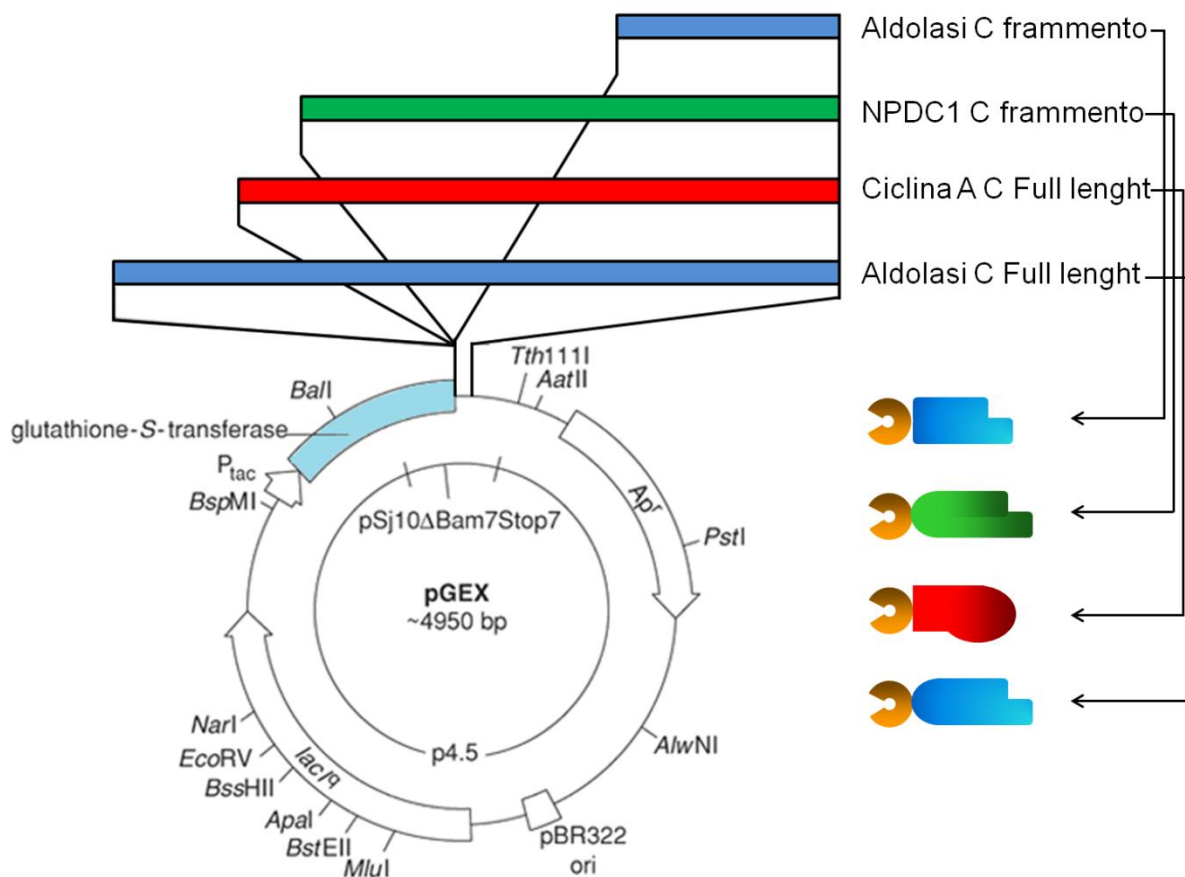


Figura 6: rappresentazione grafica del vettore di espressione pGEX, dei cDNA clonati al suo interno e delle proteine ricombinanti prodotte in batteri E. Coli “*One Shot® BL21(DE3)*” “Invitrogen”, chimicamente competenti.

Per ciascuno degli esperimenti di *GST-pull-down* cellule di *E. Coli* “One Shot® BL21(DE3)” “Invitrogen”, rese chimicamente competenti, sono state trasformate separatamente con i plasmidi ricombinanti e con il vettore vuoto mediante *shock termico* e piastrate su terreno selettivo LB agar con ampicillina (100 mg/ml). Le piastre sono state poste in un incubatore termostato a 37°C per un’intera notte. Il giorno seguente, a partire da alcune colonie batteriche sono stati effettuati gli inoculi in 5 ml di terreno liquido LB con ampicillina (100 mg/ml) in tubi “Falcon” da 15ml. Le colture sono state poste in un incubatore termostato a 37°C per la notte in condizioni di agitazione ed aerazione. Il giorno successivo è stata effettuata una diluizione degli inoculi in un volume maggiore di terreno di coltura LB (da 100 a 400 ml) ed in fase di crescita esponenziale è stata indotta la produzione della proteina mediante aggiunta di 0,1 mM di-isopropyl β -D-tiogalattopiranoside (IPTG).

L’espressione delle proteine di fusione clonate nel plasmide pGEX è infatti sotto il controllo del promotore Tac. Le colture indotte con IPTG 0.1 mM sono lasciate crescere 3 ore a 37°C. Successivamente le cellule sono state centrifugate per 30 minuti a 3000 rpm a 4°C. Il *pellet* è stato risospeso in TN *buffer* (20 mM TRIS pH 8, 100 mM NaCl) utilizzando 4 ml di *buffer* per 100 ml di coltura di partenza e congelato a -20°C.

- Purificazione delle proteine di fusione mediante cromatografia di affinità

I *pellet* risospesi in TN *buffer* sono stati scongelati lentamente in ghiaccio, la sospensione è stata sonicata 5 volte per 20” a 0,06 mV in ghiaccio, il lisato è stato fatto passare attraverso l’ago di una siringa da 5 ml 10 volte. I lisati sono stati chiarificati centrifugando a 9000 rpm per 40’, il surnatante è stato passato in un nuovo tubo, sono stati aggiunti 320 μ l di resina “Glutathione Sepharose” “GE Healthcare” al 50% per ogni 4 ml di volume e l’ incubazione con la resina è durata 60’ a temperatura ambiente. La resina è costituita da *beads* di sefarosio a cui sono legate molecole di glutatione; il glutatione ha un’altissima affinità per la proteina GST, posta all’N-terminale delle proteine ricombinanti prodotte. Le proteine di fusione si trovano così legate alla resina, grazie al legame della proteina GST con il glutatione a sua volta legato al sefarosio. (fig.7). Terminata l’incubazione i campioni sono stati centrifugati a 1000 rpm per 5’. La resina è stata lavata con TN *buffer* freddo per 5 volte, in modo da allontanare le proteine legate aspecificamente alla resina. Dopo l’ultima centrifugazione è stato allontanato il TN *buffer* e la resina con la proteina legata è stata conservata a 4°C.

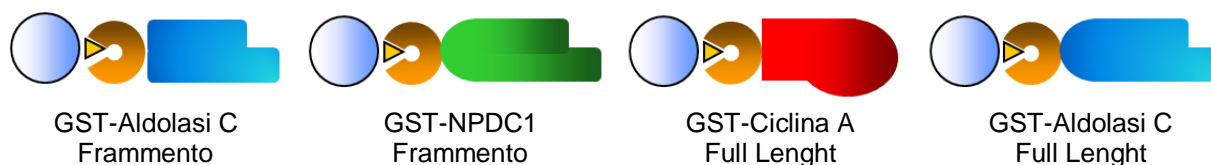


Figura 7: rappresentazione grafica delle proteine ricombinanti legate alla resina

- Quantizzazione delle proteine purificate

Allo scopo di quantizzare le proteine purificate è stata effettuata una SDS PAGE. Sul gel sono stati caricati 3 volumi differenti di una proteina a concentrazione nota: 2 µl 4 µl 6 µl di *Bovine Serum Albumine* (BSA) [1 µg/µl] e 15 µl e 30 µl della resina con le proteine di fusione legate. Per seguire la migrazione elettroforetica dei campioni sono stati caricati 8 µl di un *marker prestained*. Il gel è stato colorato al Blu di Comassie e le concentrazioni delle proteine di fusione sono state determinate confrontando la densità delle bande con quella delle bande della proteina a concentrazione nota.

- Pull-Down

5 µg delle proteine di fusione purificate e quantizzate sono state incubate per 3 ore a 4°C con 120 µg (1:24) degli estratti proteici totali ottenuti da Neuro2A, cervello e fegato di topo adulto in un idoneo volume di *binding buffer* (50 mM Hepes, 150 mM NaCl, 2.5 mM EGTA, 1 mM EDTA, 0.1% Tween-20). Dopo una prima centrifugazione di 3' a 1200 rpm a 4°C è stato recuperato il sovranatante (non legato) cioè il *pool* di proteine che non ha interagito con le proteine legate alla resina. La resina è stata poi lavata per 5 volte nello stesso *buffer* ed il complesso multiproteico legato alla resina è stato successivamente eluito utilizzando glutatione ridotto. Per ogni eluizione è stato utilizzato un volume di *elution buffer* (50 mM TRIS pH 8, 1 mM DTT, 1 mM EDTA pH 8, 0.5 mM PMSF, 1:100 "*Protease Inhibitor Coctail*" "*Roche*", 10 mM Glutatione ridotto) pari a quello della resina al 50%. La resina è stata tenuta nell' "*elution buffer*" per 10', trascorsi i quali i campioni sono stati centrifugati a temperatura ambiente a 4000 rpm per 5'. Il surnatante è stato analizzato mediante SDS-PAGE e successivo *Western Blot* seguendo il protocollo descritto nei paragrafi successivi.

3.7. Esperimenti di co-immunoprecipitazione

- Con anticorpo specifico Anti-Aldolasi C e resina A/G Plus-Agarose

Per ciascuna co-immunoprecipitazione effettuata utilizzando la proteina endogena 2 µg di anticorpo diretto contro la proteina aldolasi C sono stati incubati con 1 mg di estratti proteici totali e frazionati ottenuti dalla linea cellulare Neuro2A ed estratti totali da fegato di topo adulto (come controllo negativo). L'incubazione è durata una notte su ruotina a 4°C. Successivamente è stata aggiunta la resina "*A/G Plus-Agarose*" "*Santa Cruz Biotechnologies*" (20 µl per campione) che lega la porzione cristallizzabile (Fc) degli anticorpi. I campioni sono stati messi in agitazione su ruotina 1 ora a 4°C. Il protocollo prevede poi una centrifugazione a 2500 rpm per 5' a 4°C seguita da tre lavaggi con 1 ml di *buffer* di lisi (la cui composizione è riportata nel paragrafo 3.5). Dopo l'ultimo lavaggio è stata eseguita un'ultima centrifugazione a 2500 rpm per 5 minuti a 4°C ed il surnatante è stato allontanato (non legato). La resina è stata risospesa direttamente in "*loading buffer leammly*" "*Biorad*" con aggiunta di β Mercaptoetanolo 1:10, bollita a 95°C per 10', poi tenuta in ghiaccio 1' e centrifugata.

Il surnatante è stato analizzato mediante SDS-PAGE e successivo *Western Blot* seguendo il protocollo descritto nei paragrafi successivi.

- Con la resina “ANTI-FLAG M2 Affinity Gel” “Sigma”

Gli esperimenti con la resina “ANTI-FLAG M2 Affinity Gel” “Sigma” sono stati effettuati utilizzando estratti totali o frazionati dalla linea cellulare Neuro2A precedentemente trasfettata con p3xFLAG-Aldolasi C (Fig.8). La resina consiste in una sospensione di microsfere di agarosio sulle quali sono legate covalentemente IgG monoclonali murine dirette contro l'epitopo FLAG, costituito da una sequenza di 8 amminoacidi ripetuta 3 volte (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys).

Le immunoglobuline monoclonali presenti sulla resina legano solo l'epitopo presente all'N-terminale delle proteine ricombinanti prodotte a seguito della trasfezione, questo consente una purificazione accurata della proteina prodotta, che porterà con sé gli eventuali interattori legati ad essa nella cellula.

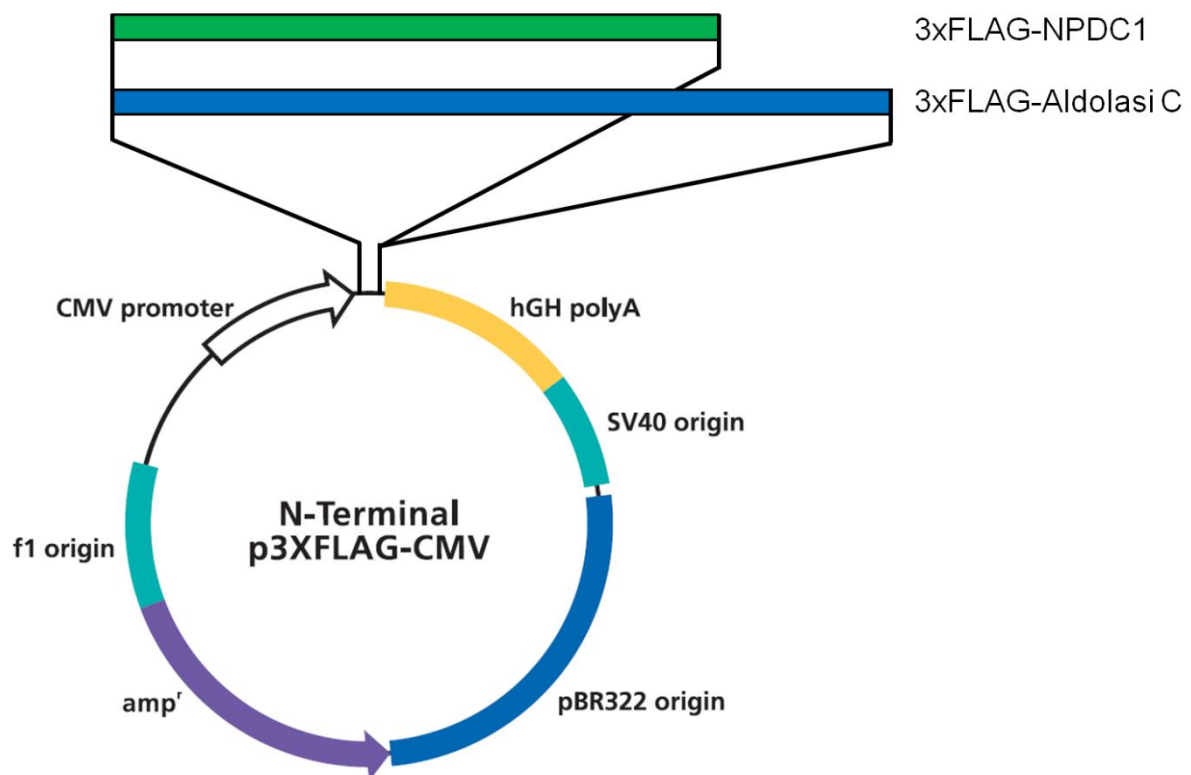


Figura 8: rappresentazione grafica del vettore p3xFLAG-CMV-7.1 con all'interno clonate le sequenze codificanti per le proteine aldolasi C ed NPDC1.

20 µl di resina risospesa nel proprio tampone sono stati utilizzati per ogni mg di estratto proteico. La resina anti-FLAG, prima dell'utilizzo, è stata sottoposta ad una serie di lavaggi “*in batch*” con il *buffer* di lavaggio (50 mM TRIS pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8) al fine di allontanare il tampone di conservazione.

Terminati i lavaggi, la resina è stata incubata nell'estratto proteico contenuto in un tubo “*Falcon*” e posta in lenta agitazione a 4°C per 3 ore, trascorse le quali si è

provveduto a centrifugare a 3000 rpm per 5' a 4°C. Il sovranatante contenente le proteine non legatesi alla resina è stato rimosso e conservato a -80°C al fine di verificare poi l'efficienza dell'immunoprecipitazione mediante *Western Blot*. La resina è stata quindi lavata 3 volte con un volume di *buffer* di lavaggio (50 mM TRIS pH 8, 300 mM NaCl, 10% Glicerolo, 0.5 mM PMSF, 1 mM EDTA pH 8, 0.1% NP40, 1:100 "*Protease Inhibitor Cocktail*" "*Roche*") pari a quello della resina. Ad ogni lavaggio la resina, dopo essere stata agitata manualmente, è stata centrifugata per 2' a 3000 rpm. Ulteriori 3 lavaggi sono stati effettuati con un altro *buffer* di lavaggio (50mM TRIS pH8, 150mM NaCl, 10% Glicerolo, 0.5mM PMSF, 1mM EDTA pH8, 0.1% NP40, 1:100 "*Protease Inhibitor Cocktail*" "*Roche*").

L'eluizione del complesso multiproteico legato alla resina è avvenuta incubando per 30' a 4°C la resina con il *buffer* di eluizione (50 mM TRIS pH 8, 150 mM NaCl, 10% Glicerolo, 0.5 mM PMSF, 1 mM EDTA pH 8, 0.1% NP40, 1:100 "*Protease Inhibitor Cocktail*" "*Roche*", 200µg/ml *Peptide 3X-FLAG* "*Sigma*"). In questo modo il peptide FLAG, competendo con i siti di legame dell'anticorpo adeso alle *beads* di agarosio, spiazza le proteine ricombinanti FLAG-Aldolasi C.

Infine l'eluato è stato raccolto centrifugando a 3000 rpm per 2'. Una piccola frazione, 10 µl dell'immunoprecipitato, e la restante parte degli eluati sono stati analizzati mediante SDS-PAGE al 10% e successivo *Western Blot*, al fine di valutare l'efficienza della metodica ed i risultati degli esperimenti.

3.8. SDS PAGE e Western Blot

Per gli esperimenti di *SDS PAGE* e di *Western Blot* i gel sono stati preparati all'8% o al 10% di poliacrilammide. I campioni (proteine purificate, eluati da esperimenti di *GST-pull-down* e da esperimenti di co-immunoprecipitazione, estratti proteici totali e frazionati) sono stati caricati su gel dopo esser stati miscelati 1:1 con il "*loading buffer leammli*" "*Biorad*" con aggiunta di β-Mercaptoetanol 1:10. Le corse elettroforetiche sono state effettuate nel tampone Tris-Glicina/SDS (1X/0.1%). Per gli esperimenti di *SDS PAGE*, i gel sono stati colorati con Blu di Comassie. Per gli esperimenti di *Western Blot*, le proteine dal gel sono state trasferite su di una membrana di nitrocellulosa "*Amersham Hybond™ ECL™*" "*GE Healthcare*" mediante *elettroblotting*, per il trasferimento è stata utilizzato il tampone Tris-Glicina 1X. Successivamente alla corsa elettroforetica, il filtro è stato colorato con "*Rosso Ponceau*" "*Bio-Rad*" per escludere eventuali problemi nel trasferimento e decolorato effettuando alcuni lavaggi in acqua.

La membrana di nitrocellulosa è stata posta per 2 ore a temperatura ambiente in agitazione nella soluzione di *blocking* (1X TBS, 0,1% Tween-20, 5% "*Blotting Grade Blocker, Non Fat Dry Milk*" "*Bio-Rad*") per saturare i siti liberi sulla membrana. In seguito, la membrana è stata incubata per una notte a 4°C con una diluizione opportuna dell'anticorpo specifico (fatta eccezione per gli anticorpi anti-FLAG, anti-Tubulina e anti YY1, tenuti in incubazione 2 ore a temperatura ambiente). La diluizione è stata preparata nella stessa soluzione di *blocking*. Tutte le diluizioni utilizzate sono indicate nella tabella 4.

Anticorpo	Ditta	Diluizione
Anti-Aldolasi C monoclonale	"Promab"	1:1000
Anti-NPDC1	"Santa Cruz Biotechnologies"	1:500
Anti-Ciclina A	"Santa Cruz Biotechnologies"	1:1000
Anti-YY1	"Santa Cruz Biotechnologies"	1:1000
Anti-Tubulina	"Sigma"	1:500
Anti-FLAG	"Sigma"	1:8000
Anti-fosfo-ERK	"Santa Cruz Biotechnologies"	1:500

Tabella 4: anticorpi utilizzati per *Western Blot*, produzione e opportuna diluizione

La soluzione contenente l'anticorpo primario è stata quindi allontanata, sono stati effettuati 3 lavaggi in una soluzione costituita da 1XTBS, 0,1% Tween-20 per eliminare l'anticorpo primario in eccesso; la membrana è stata successivamente incubata per 45' a temperatura ambiente con una diluizione opportuna dell'anticorpo secondario preparata nella stessa soluzione utilizzata per il *blocking*. Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi (tutti marcati con perossidasi di rafano) secondo le seguenti diluizioni: *anti-mouse* (GE Healthcare) ed *anti-rabbit* (GE Healthcare) 1:5000, *anti-goat* (Santa-Cruz Biotechnologies) 1:10000. Sono stati dunque effettuati nuovamente 3 lavaggi nella soluzione di lavaggio ed è stato effettuato il saggio di chemiluminescenza. Per i saggi di chemiluminescenza sono stati utilizzati i seguenti *kit*: "Amersham ECL™" e "Amersham ECL Plus™" "GE Healthcare". La luce emessa è stata rilevata esponendo una lastra fotografica sulla membrana di nitrocellulosa. Le analisi di densitometria sono state effettuate utilizzando il programma "Scion Image" della "Scion Corporation".

3.9. Esperimenti di immunofluorescenza

Per gli esperimenti di immunofluorescenza, le cellule della linea PC12 sono state piastrate in piastrine "*μ-Slide VI*" "*Ibidi*" (Fig. 9). In ciascun pozzetto sono state poste circa 20000 cellule in 100μl di RPMI complementato come descritto nel paragrafo 3.2.

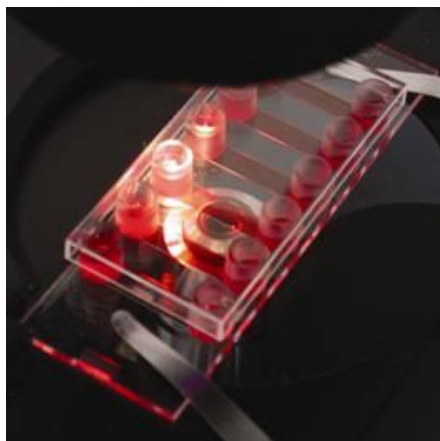


Figura 9: piastrina utilizzata per esperimenti di immunofluorescenza.

Le immunofluorescenze sono state eseguite in momenti differenti del differenziamento neuronale. Le cellule sono infatti state fissate dopo 2 h, 1 giorno e 3 giorni dal trattamento con NGF ed al tempo zero (in assenza di NGF).

Il mezzo di coltura è stato rimosso e sono stati effettuati 3 lavaggi in PBS + Ca^{2+} e Mg^{2+} ; le cellule sono state poi fissate utilizzando paraformaldeide al 2% per 20', è stato quindi effettuato un lavaggio con PBS + Ca^{2+} e Mg^{2+} , è stata aggiunta una soluzione 50 mM di NH_4Cl per 10' ed è stato effettuato un altro lavaggio in PBS + Ca^{2+} e Mg^{2+} . La permeabilizzazione è stata effettuata con la soluzione PBS-1% BSA (*Bovine Serum Albumin*) 0,2% Triton® X-100 "*Sigma*" (2 incubazioni da 5'). Dopo un lavaggio con PBS-1% BSA, è stata aggiunta la soluzione contenente l'anticorpo primario (PBS-1% BSA e anticorpo). Nella tabella 5 sono indicati gli anticorpi e le diluizioni utilizzate.

Anticorpo	Produzione	Diluizione
Anti-Aldolasi C policlonale	" <i>Primm-Biotech Inc.</i> "	1:250
Anti-Ciclina A	" <i>Santa Cruz Biotechnologies</i> "	1:50
Anti-Atassina 10	" <i>Santa Cruz Biotechnologies</i> "	1:20

Tabella 5: anticorpi utilizzati per immunofluorescenza, ditta e opportuna diluizione

Le cellule sono state tenute nella soluzione contenente l'anticorpo primario per 2 ore. Allontanata la soluzione con l'anticorpo primario sono stati effettuati 3 lavaggi con PBS 1% BSA ed è stata aggiunta la soluzione contenente l'anticorpo secondario coniugato ad un fluorocromo (PBS 1% BSA e anticorpo). Gli anticorpi secondari utilizzati sono un anti-rabbit-cy2 ed un anti-goat-cy2 (*Jackson ImmunoResearch Lab. Inc.*) utilizzati ad una diluizione 1:200. La cianina 2 ha un picco di eccitazione a 492 nm ed un picco di emissione a 510 nm, la cianina 3 ha un picco di assorbimento a 550 nm ed un picco di emissione a 570 nm. Le cellule sono state tenute nella soluzione contenente l'anticorpo secondario per un'ora al buio. Sono stati effettuati 3 lavaggi in PBS 1% BSA ed un lavaggio in PBS + Ca^{2+} e Mg^{2+} . È stata poi aggiunta una soluzione contenente il reagente DAPI (4,6-Diammino-2-fenilindolo) 1:1000 che colora i nuclei. Questo reagente si lega al DNA ed ha un picco di assorbimento a 358 nm ed un picco di emissione a 461 nm. Le cellule sono state tenute in questa soluzione per 10' al buio. Sono stati effettuati 3 lavaggi con PBS ed è stata aggiunta una soluzione PBS-Glicerolo 1:1. Le piastrine sono state conservate a 4°C e poi osservate al microscopio confocale (*Axiovert 200 Microscope Zeiss* equipaggiato con il sistema laser confocale *LSM 510 META Zeiss*).

4. RISULTATI

4.1. Analisi *in-silico* dei putativi interattori molecolari della proteina aldolasi C

Allo scopo di interpretare in maniera funzionale i risultati ottenuti dalle analisi di doppio ibrido in lievito (*output*) riguardanti i putativi interattori dell'aldolasi C, ho utilizzato il software IPA: "*Ingenuity Pathway Analysis*". Il software lavora su di un *data base* che conserva dati relativi alle interazioni proteina-proteina ottenuti da studi bibliografici. In questo modo può risultare più semplice elaborare i dati, costruire un *pathway* e confermare le ipotesi. I risultati ottenuti dal software hanno avvalorato un'ipotesi da me formulata, secondo cui la proteina aldolasi C potrebbe interagire oltre che con NPDC1 anche con la proteina ciclina A (Fig.10).

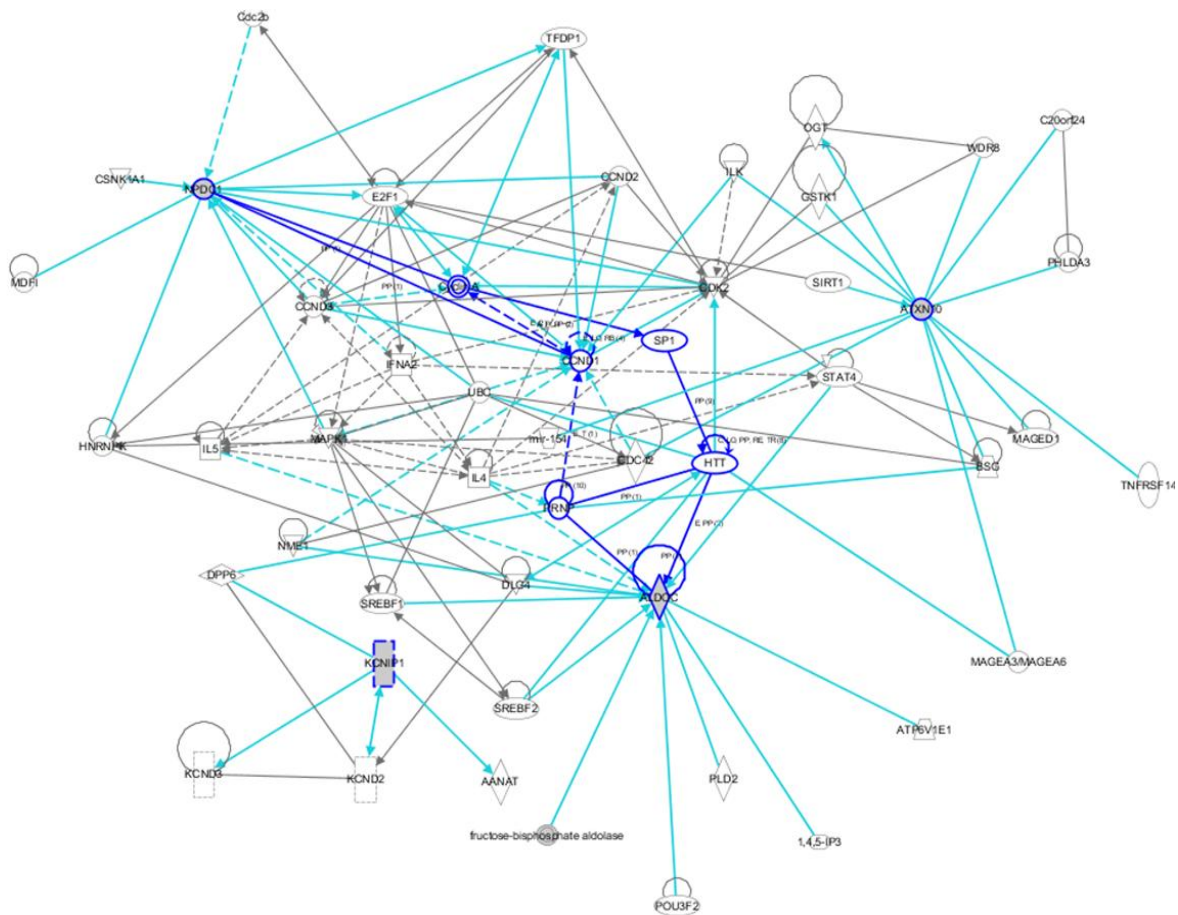


Figura 10: schema riassuntivo dei risultati ottenuti dall'analisi in silico utilizzando il software IPA

4.2. Validazione delle interazioni delle proteine NPDC1 e ciclina A con aldolasi C mediante esperimenti di GST-pull-down

Per validare l'interazione tra la proteina aldolasi C e le proteine NPDC1 e ciclina A ho approntato alcuni esperimenti di *GST-pull-down*. Ho utilizzato le proteine esca ricombinanti: GST-NPDC1 frammento (isolato dallo *screening* in lievito) e GST-Ciclina A *full length*, cimentandole con estratti proteici totali da cervello di topo e dalla linea cellulare Neuro2A.

Ho effettuato esperimenti analoghi utilizzando come esche le proteine di fusione GST-aldolasi C *full length* (GST-Aldolasi C FL) e GST-aldolasi C frammento C-terminale di 35 amminoacidi (GST-Aldolasi C Fr).

Abbiamo clonato le sequenze codificanti per le proteine NPDC1 frammento, ciclina A, aldolasi C ed aldolasi C frammento, *in frame* nel vettore di espressione procariotico pGEX, a valle della sequenza codificante per la proteina glutatione S-transferasi (GST) in modo tale da ottenere rispettivamente le proteine di fusione GST-NPDC1 frammento (GST-NPDC1f), GST-Ciclina A *full length* (GST-Ciclina A FL), GST-Aldolasi C *full length* (GST-Aldolasi C FL) e GST-Aldolasi C frammento (GST-Aldolasi C Fr).

- Esperimenti effettuati utilizzando come esche le proteine GST-NPDC1f e GST-Ciclina A FL

Le proteine ricombinanti GST-NPDC1f e GST-Ciclina A FL legate alla resina sono state cimentate con estratti proteici ottenuti da cervello e fegato di topo adulto (indicati nelle immagini come *brain* e *liver*) e dalla linea cellulare Neuro2A (indicati nelle immagini come *N2A*). Le proteine così legate alla resina sono state successivamente eluite assieme alle relative esche e gli eluati sono stati analizzati mediante *Western Blot*.

In figura 11 è mostrato il risultato di un *Western Blot* relativo al *GST-pull-down* in cui è stata utilizzata come esca la proteina GST-NPDC1f. È possibile visualizzare la banda immunoreattiva relativa all'aldolasi C nelle piste 4 e 5; ciò sta ad indicare che la proteina aldolasi C endogena, espressa nel cervello di topo adulto e nelle Neuro2A, lega la proteina di fusione GST-NPDC1f. L'aldolasi C non interagisce invece con la sola proteina GST (piste 1, 2) ciò conferma che il legame è diretto in maniera specifica alla proteina NPDC1f. Quale controllo negativo dell'esperimento la proteina da fusione GST-NPDC1f è stata cimentata con l'estratto proteico da fegato di topo adulto, in tale tessuto infatti l'aldolasi C non è espressa e non si visualizza alcuna banda immunoreattiva nella pista 6 in cui è stato caricato il relativo eluato.

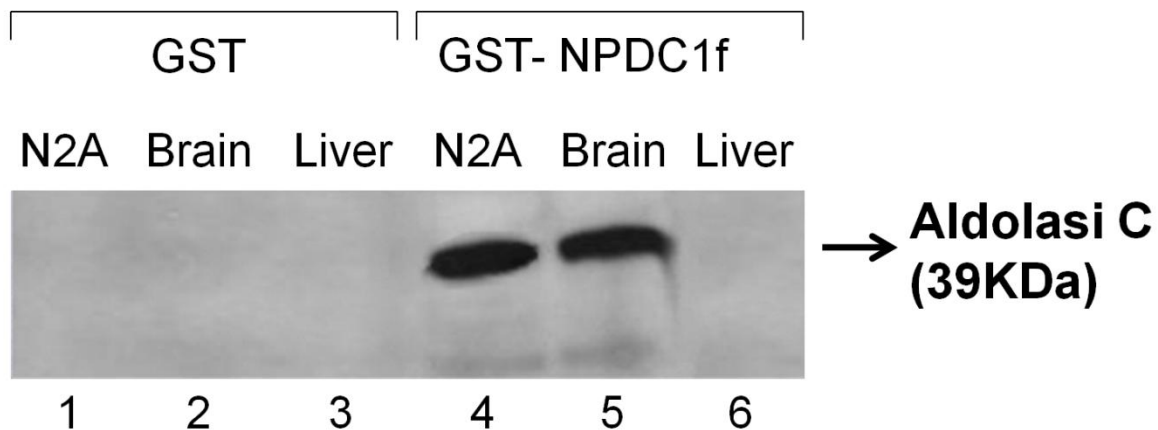


Figura 11: *GST-pull-down* eseguito utilizzando come esca la proteina di fusione GST-NPDC1f. Per la rivelazione è stato utilizzato un anticorpo monoclonale anti-aldolasi C. Sono presenti nelle piste 4 e 5 le bande immunoreattive di 39KDa corrispondenti alla proteina aldolasi C; nessuna banda immunoreattiva è presente nella pista 6 in cui è stato caricato l'eluato ottenuto cimentando la proteina di fusione GST-NPDC1f con l'estratto da fegato di topo adulto e nelle piste 1, 2 e 3 in cui sono stati caricati gli eluati ottenuti cimentando la sola proteina GST con gli estratti proteici.

In figura 12 è invece riportato il risultato di un *Western Blot* relativo al *GST-pull-down* realizzato utilizzando come esca la proteina di fusione GST-Ciclina A FL. Le bande immunoreattive relative all'aldolasi C nelle piste 4 e 5 confermano l'interazione tra ciclina A ed aldolasi C in estratti ottenuti da cervello di topo adulto e da cellule Neuro2A; aldolasi C non interagisce con la proteina GST da sola (piste 1, 2); come controllo negativo la proteina da fusione GST-Ciclina A FL è stata cimentata con l'estratto proteico da fegato di topo adulto, pista 6 e non si visualizza alcuna banda immunoreattiva.

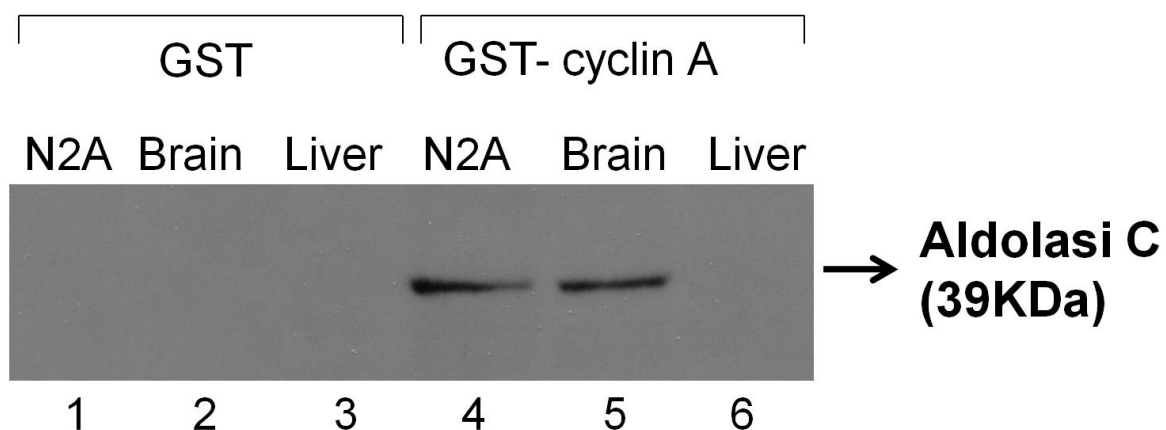


Figura 12: *GST-pull-down* eseguito utilizzando come esca la proteina di fusione GST-Ciclina A FL. Per la rivelazione è stato utilizzato un anticorpo monoclonale anti-aldolasi C. Si notino nelle *lane* 4 e 5 le bande immunoreattive di 39KDa relative alla proteina aldolasi C; nessuna banda immunoreattiva è presente nella pista 6 in cui è stato caricato l'eluato ottenuto cimentando la proteina di fusione GST-Ciclina A con l'estratto da fegato di topo adulto e nelle piste 1, 2 e 3 in cui sono stati caricati gli eluati ottenuti cimentando la sola proteina GST con gli estratti proteici.

- Esperimenti effettuati utilizzando come esche le proteine GST-Aldolasi C FL e GST-Aldolasi C Fr

Gli esperimenti di *GST-pull-down* effettuati utilizzando la proteina GST-NPDC1f come esca hanno confermato l'interazione tra la proteina NPDC1 e la proteina aldolasi C evidenziata con la tecnica del doppio ibrido in lievito. L'interazione tra la proteina aldolasi C e la proteina ciclina A non era stata evidenziata con la tecnica del doppio ibrido. Pertanto ho ritenuto opportuno effettuare ulteriori esperimenti di *GST-pull-down*. Ho utilizzato come esche le proteine GST-Aldolasi C FL e GST-Aldolasi C Fr. La proteina aldolasi C Fr è la stessa utilizzata nell'esperimento di doppio ibrido in lievito.

Le proteine ricombinanti GST-Aldolasi C FL e GST-Aldolasi C Fr legate alla resina sono state cimentate con estratti proteici ottenuti da cervello di topo adulto (indicati nelle immagini come *brain*) e dalla linea cellulare Neuro2A (indicati nelle immagini come N2A). Le proteine legate alla resina sono state eluite assieme alle relative esche e gli eluati sono stati analizzati mediante *Western Blot*. I filtri di nitrocellulosa sono stati ibridati con un anticorpo diretto contro la ciclina A.

In figura 13 è riportato il risultato del relativo *Western Blot*. La banda immunoreattiva relativa alla proteina ciclina A è presente nelle piste 3, 4, 5 e 6. Nelle piste 3 e 4 sono stati caricati gli eluati ottenuti utilizzando la proteina di fusione GST-Aldolasi C FL, nelle piste 5 e 6 sono stati caricati gli eluati ottenuti utilizzando la proteina di fusione GST-Aldolasi C Fr. La presenza delle bande immunoreattive in queste piste sta ad indicare la presenza della proteina ciclina A nel complesso proteico legato alla resina e dunque conferma l'interazione tra le 2 proteine. Nessuna banda immunoreattiva è rilevabile nelle piste 1 e 2, in cui sono stati caricati gli eluati ottenuti utilizzando la sola proteina GST. Inoltre l'esperimento ci ha fornito una ulteriore informazione: la ciclina A per interagire con l'aldolasi C si lega con molta probabilità alla porzione C-terminale di quest'ultima (piste 5,6).

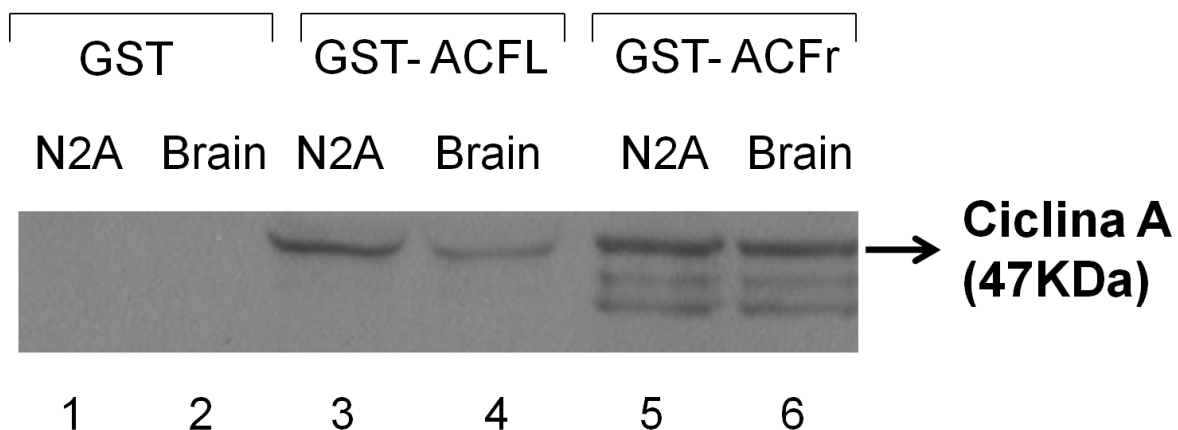


Figura 13: *GST-pull-down* eseguito utilizzando come esche le proteina di fusione GST-Aldolasi C FL e GST-Aldolasi C Fr. Per la rivelazione è stato utilizzato un anticorpo diretto contro la proteina ciclina A. Si notino nelle piste 3, 4, 5 e 6 le bande immunoreattive di 47KDa relative alla proteina ciclina A. Nessuna banda immunoreattiva è rilevabile nelle piste 1 e 2.

Ibridando gli stessi filtri con un anticorpo diretto contro la proteina NPDC1 non si evidenzia una banda immunoreattiva corrispondente alla proteina, ciò fa ipotizzare che l'interazione tra aldolasi C e ciclina A sia indipendente da NPDC1.

4.3. Co-immunoprecipitazione di NPDC1 e ciclina A con anticorpo monoclonale anti-Aldolasi C

Al fine di confermare ulteriormente le interazioni osservate con le proteine NPDC1 e ciclina A ho effettuato esperimenti di co-immunoprecipitazione utilizzando un anticorpo monoclonale diretto contro la proteina aldolasi C. L'anticorpo è stato cimentato con estratti proteici totali e frazionati dalla linea Neuro2A che esprimono NPDC1 e ciclina A ed estratti totali da fegato di topo adulto come controllo negativo.

Nelle figure 14 e 15 è possibile osservare i risultati delle analisi di *Western Blot* effettuate sugli eluati. Nelle piste 1 e 2 sono stati caricati gli eluati degli immunoprecipitati ottenuti con estratti totali (N2AT) e nucleari (N2AN) da Neuro2A. Nelle piste 3 e 4, sono stati caricati gli eluati degli immunoprecipitati ottenuti con estratti citosolici da Neuro2A (N2AC) ed estratti totali da fegato di topo adulto (*liver*).

Il filtro relativo al *Western Blot* mostrato in figura 14 è stato ibridato con un anticorpo diretto contro la proteina NPDC1. Si osserva la presenza delle bande immunoreattive nelle piste 1 e 2. Si osserva una banda più intensa nella pista 2, e l'assenza della banda immunoreattiva nella pista 3; ciò suggerisce che l'interazione tra le due proteine avviene nel nucleo ed è specifica, vista l'assenza di bande immunoreattive nella pista 4 relativa agli eluati degli immunoprecipitati ottenuti da estratti di fegato di topo adulto.

Questo risultato è importante dal punto di vista funzionale in quanto la proteina NPDC1 svolge nel nucleo importanti funzioni regolatorie. La proteina è infatti in grado di bloccare l'attivazione trascrizionale mediata da E2F1 su geni importanti per la progressione del ciclo cellulare e la proteina aldolasi C potrebbe avere un ruolo in questo processo dal momento che l'interazione tra le due proteine avviene nel nucleo.

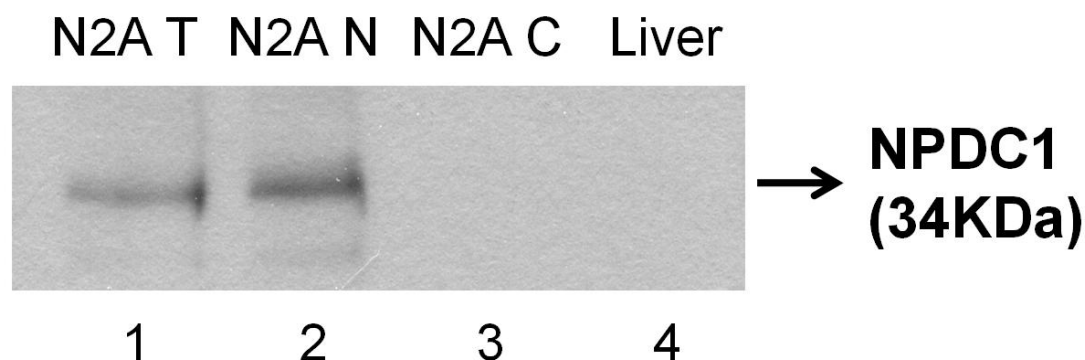


Figura 14: co-immunoprecipitazione effettuata con un anticorpo diretto contro la proteina aldolasi C. Nelle piste 1 e 2, relative agli eluati ottenuti dagli estratti totali e nucleari da Neuro2A, sono presenti le bande immunoreattive relative alla proteina NPDC1. Non sono presenti bande immunoreattive nella pista 3 e nella pista 4 in cui sono stati caricati gli eluati ottenuti dagli estratti citosolici da Neuro2A e totali da fegato di topo adulto.

In figura 15, la rilevazione su filtro di nitrocellulosa è stata effettuata utilizzando un anticorpo diretto contro la proteina ciclina A. Sono presenti le bande immunoreattive relative alla proteina ciclina A nelle piste 1 e 3 in cui sono stati caricati gli eluati ottenuti da estratti totali e citosolici da Neuro2A; non si evidenziano bande nella pista 2 relativa alla co-immunoprecipitazione effettuata su estratti nucleari da Neuro2A e nella pista 4 relativa alla co-immunoprecipitazione effettuata, come controllo negativo su estratti totali da fegato di topo adulto. Questo risultato conferma l'interazione tra le proteine aldolasi C e ciclina A in Neuro2A e ci indica che esse interagiscono nel citosol della linea cellulare Neuro2A. L'interazione tra le due proteine risulta essere un dato importante in quanto ci suggerisce che l'aldolasi C possa essere coinvolta nei processi di inattivazione che la ciclina A subisce nel corso del differenziamento neuronale. Il fatto che l'interazione avvenga nel citosol avvalorata questa ipotesi.

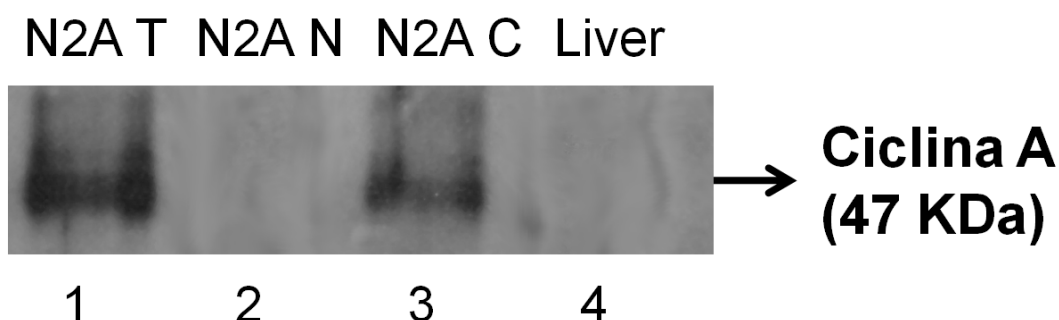


Figura 15: co-immunoprecipitazione effettuata con un anticorpo diretto contro la proteina aldolasi C. Si notino nelle piste 1 e 3 le bande immunoreattive relative alla proteina ciclina A. Non sono presenti bande immunoreattive nella pista 2 e nella pista 4 relative alla co-immunoprecipitazione effettuata con estratti nucleari da Neuro2A e alla co-immunoprecipitazione effettuata, come controllo negativo, con estratti di fegato di topo adulto.

4.4. Co-immunoprecipitazione di NPDC1 e ciclina A con la resina “Anti- FLAG” da estratti proteici totali ottenuti da cellule Neuro2A trasfettate con il costrutto p3xFLAG-Aldolasi C

A partire da estratti proteici totali effettuati da cellule Neuro2A trasfettate con il vettore p3xFLAG con all'interno clonata la sequenza codificante per l'intera proteina aldolasi C sono stati effettuati esperimenti di co-immunoprecipitazione con la resina anti-FLAG. Il complesso proteico legato alla resina mediante l'anticorpo anti-FLAG è stato eluito e gli eluati sono stati analizzati mediante *Western Blot* (Fig.16).

Per la rilevazione delle proteine su filtro abbiamo utilizzato anticorpi diretti contro le proteine ciclina A ed NPDC1. Come possiamo vedere in figura 16 l'interazione tra le proteine aldolasi C e le proteine NPDC1 e ciclina A è stata confermata anche mediante questo approccio sperimentale. È possibile visualizzare le bande immunoreattive solo nella pista 1 relative alle immunoprecipitazioni effettuate a partire da estratti da cellula trasfettate con il costrutto p3xFLAG-aldolasi C (indicato in figura come FLAG Ac). Non sono presenti bande nelle piste 2 e 3, relative alle immunoprecipitazioni effettuate a partire da cellule trasfettate con il vettore vuoto

(indicato in figura come FLAG) ed a partire da cellule non trasfettate (indicato in figura come NT).

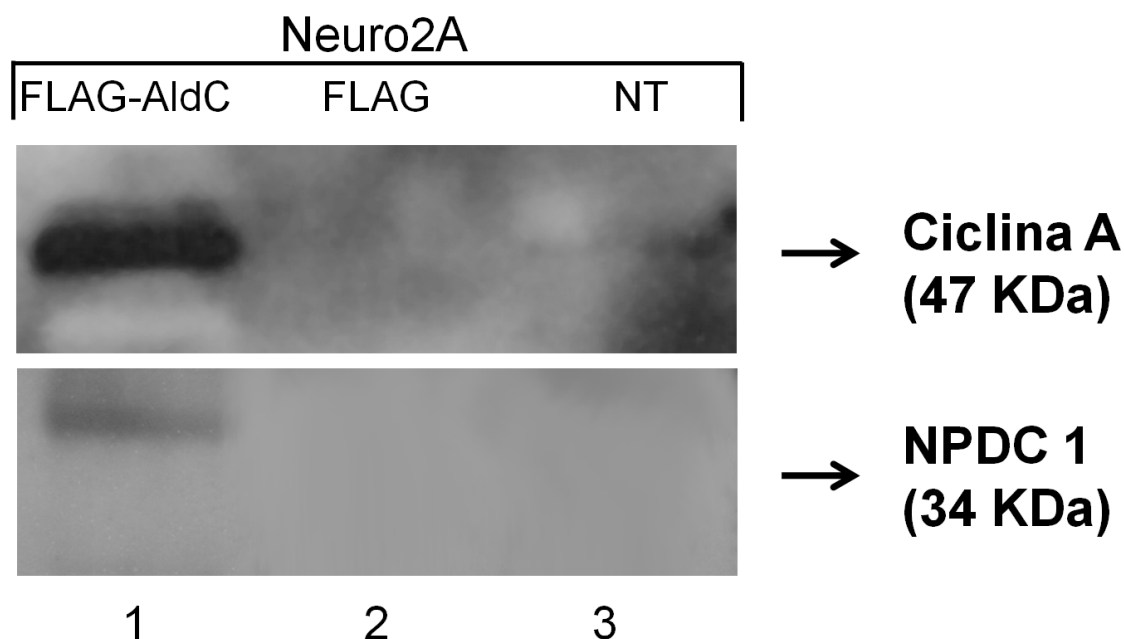


Figura 16: co-immunoprecipitazione effettuata con resina anti-FLAG da estratti proteici totali da Neuro2A trasfettate con il vettore p3xFLAG-Aldolasi C. Sono presenti nella pista 1 le bande immunoreattive relative alle proteine ciclina A ed NPDC1. Non sono presenti bande immunoreattive nelle piste 2 e 3 relative alle co-immunoprecipitazioni effettuate con estratti totali da Neuro2A trasfettate con il vettore vuoto e da cellule non trasfettate.

Tali risultati confermano ulteriormente le interazioni tra la proteina aldolasi C e le proteine NPDC1 e ciclina A, entrambe coinvolte nella complessa regolazione del differenziamento neuronale.

4.5. Analisi dell'espressione di aldolasi C, ciclina A e fosfo ERK 1/2 in cellule PC12 indotte al differenziamento neuronale con NGF ed in cellule PC12 trasfettate con il costrutto p3xFLAG-Aldolasi C

Allo scopo di comprendere meglio il possibile ruolo dell'aldolasi C nel differenziamento neuronale ho portato avanti alcuni studi preliminari sulla linea cellulare PC12. Ho analizzato in dettaglio i livelli di espressione delle proteine aldolasi C e ciclina A nel citosol di tali cellule in differenti momenti del differenziamento indotto da NGF.

Precedentemente nel laboratorio dove ho svolto il dottorato è stato dimostrato che nel corso del differenziamento neuronale, indotto da NGF in cellule PC12, i livelli dell'RNA messaggero di aldolasi C aumentano. I livelli di espressione sono stati valutati in *time course*: dal tempo 0 (cellule non trattate) fino a 14 giorni di trattamento con NGF con tempi intermedi a 2h, 1 giorno, 3 giorni e 7 giorni. Ho riprodotto l'esperimento seguendo lo stesso *time course* fino a 3 giorni di trattamento

con NGF ed ho effettuato esperimenti di *Western Blot* su estratti citosolici ottenuti dalle cellule PC12 indotte al differenziamento neuronale con NGF. Abbiamo utilizzato anticorpi diretti contro le proteine: aldolasi C, ciclina A e contro le proteine ERK 1 e 2 fosforilate (figura17).

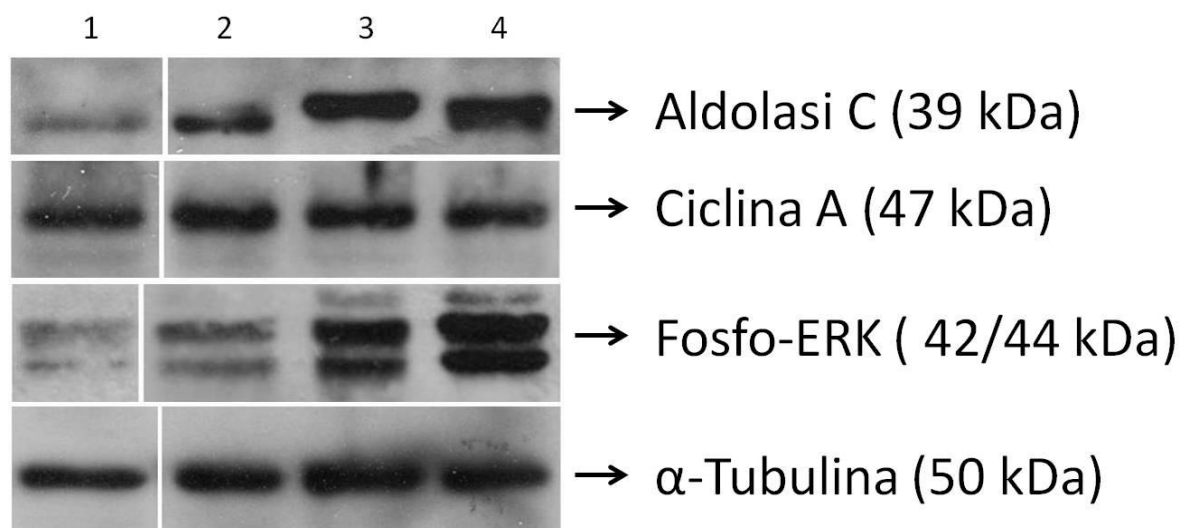


Figura 17: *Western Blot* relativo all'espressione delle proteine aldolasi C, ciclina A, ERK 1 e 2 fosforilate (fosfo-ERK), ed α -tubulina in diversi momenti del differenziamento neuronale indotto da NGF. Nella pista 1 sono stati caricati estratti proteici totali da cellule PC12 non indotte al differenziamento, nelle piste 2, 3 e 4 sono stati caricati estratti citosolici da cellule PC12 in diversi momenti successivi al trattamento con NGF (rispettivamente a 2 ore, ad un giorno e a 3 giorni dal trattamento). La proteina α -tubulina è stata utilizzata come normalizzatore nelle analisi densitometriche.

Nella pista 1 sono stati caricati estratti citosolici ottenuti da cellule PC12 non indotte al differenziamento, nelle piste 2, 3 e 4 sono stati caricati estratti citosolici ottenuti da cellule PC12 dopo 2 ore, 1 giorno e 3 giorni dal trattamento con NGF. È possibile osservare come l'intensità delle bande immunoreattive di aldolasi C ed ERK 1 e 2 fosforilate (indicate in figura come fosfo-ERK) aumenti nel corso del differenziamento neuronale, contrariamente a quella di ciclina A che invece si riduce. Nel *Western Blot* relativo alla proteina aldolasi C è possibile osservare che già a 2h dal trattamento con NGF è visibile una banda lievemente più alta, apprezzabile meglio nella pista 3 e nella pista 4. La proteina aldolasi C potrebbe dunque subire delle modifiche post-traduzionali. Abbiamo ipotizzato un evento fosforilativo (evento descritto anche in letteratura nel corso di altri processi) (86) ma serviranno altri esperimenti per confermare questo dato.

In figura 18 sono riportati i grafici ottenuti dall'analisi densitometrica delle bande immunoreattive per aldolasi C, ciclina A e per la proteine ERK 1 e 2 fosforilate dei *Western Blot* mostrati in figura 17. I valori densitometrici sono stati normalizzati utilizzando le misurazioni rilevate dalle bande riferite all' α -tubulina.

Abbiamo potuto osservare come, in concordanza con gli esperimenti effettuati sugli RNA, anche la proteina aldolasi C aumenta nel corso del differenziamento neuronale (figura 18, barre in blu). La proteina ciclina A invece diminuisce nel corso del differenziamento neuronale (figura 18, barre in rosso); ciò è in accordo con dati di

letteratura (68) che indicano che i livelli di espressione della proteina ciclina A si abbassano progressivamente nel corso del differenziamento.

Abbiamo inoltre osservato i livelli di espressione del *marker* di differenziamento neuronale fosfo-ERK (figura 18, barre in verde) e come ci aspettavamo abbiamo notato che la proteina aumenta progressivamente all'aumento dei tempi di trattamento.

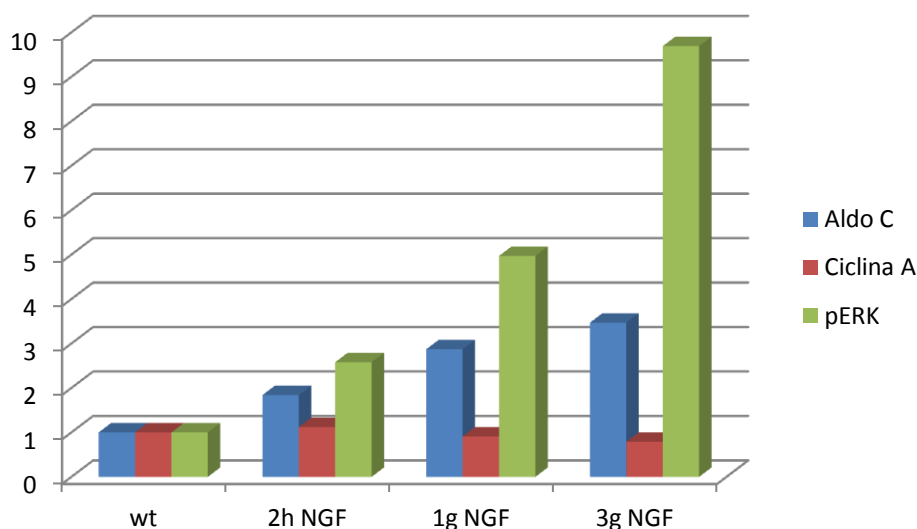


Figura 18: nel grafico sono mostrati i livelli di espressione delle proteine: aldolasi C (barre in blu), ciclina A (barre in rosso) e fosfo-ERK (barre in verde) in estratti citosolici ottenuti da cellule PC12 in diversi momenti del differenziamento neuronale indotto da NGF (2 ore, 1g e 3g). I valori sono stati rapportati al livello basale rappresentato dalle cellule non indotte al differenziamento (WT) (pista 1).

I risultati ottenuti da questi esperimenti hanno avvalorato l'ipotesi secondo cui l'espressione dell'aldolasi C aumenta nel differenziamento neuronale indotto da NGF. Ho quindi effettuato altri esperimenti per verificare se l'aumento dell'espressione di aldolasi potesse essere strettamente associato alla riduzione dell'espressione di ciclina A ed all'aumento di espressione delle proteine fosfo ERK 1/2. Abbiamo over-espresso l'aldolasi C in cellule PC12 non indotte al differenziamento neuronale per monitorare in estratti citosolici i livelli di espressione della proteina ciclina A e delle proteine ERK 1 e 2 fosforilate. Per le trasfezioni abbiamo utilizzato 1 μ g e 4 μ g del costrutto p3xFLAG-Aldolasi C (FLAG-Ald C) e le cellule sono state raccolte ad 1 giorno e a 3 giorni dalla trasfezione.

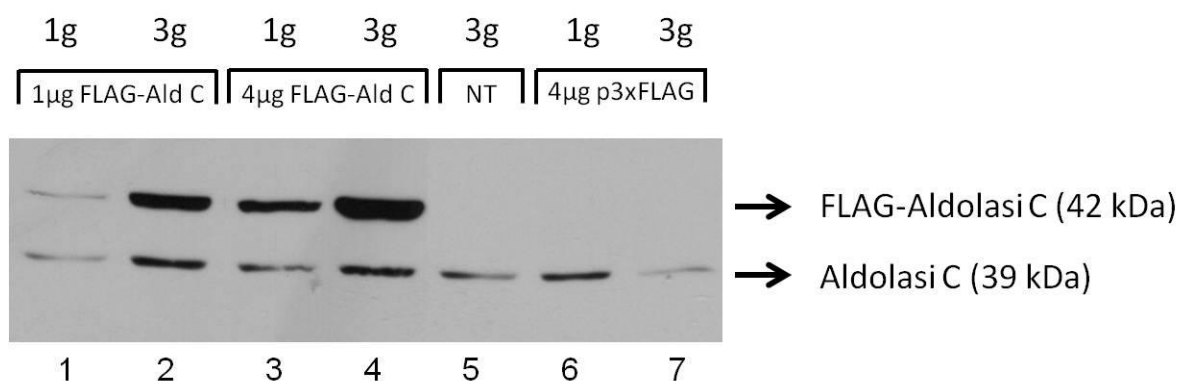


Figura 19: *Western Blot* relativo agli estratti proteici citosolici da cellule PC12 trasfettate con 1 µg e 4 µg del costrutto p3xFLAG-Aldolasi C, con 4 µg del vettore vuoto (p3xFLAG), e da cellule non trasfettate (NT). Le cellule trasfettate sono state raccolte ad 1 giorno (1g) e 3 giorni (3g) dalla trasfezione, le cellule non trasfettate sono state raccolte 3 giorni dopo esser state messe in coltura. I livelli di espressione della proteina FLAG-Aldolasi C sono proporzionali alla quantità di costrutto p3xFLAG-Aldolasi C trasfettata e sono maggiori a 3 giorni rispetto ad un giorno dalla trasfezione.

Per verificare l'espressione della proteina FLAG-Aldolasi C ho utilizzato un anticorpo monoclonale diretto contro la proteina aldolasi C. Nella figura 19 è possibile osservare 2 bande: una relativa all'aldolasi C endogena ed una relativa alla proteina FLAG-Aldolasi C. Ho verificato con calcoli densitometrici che l'espressione della proteina FLAG-Aldolasi C è proporzionale alla quantità di vettore trasfettata ed è maggiore a 3 giorni piuttosto che a 1 giorno dalla trasfezione. Ho dunque osservato come varia l'espressione delle proteine ciclina A e fosfo-ERK all'aumentare dell'espressione di aldolasi C (figure 20-22).

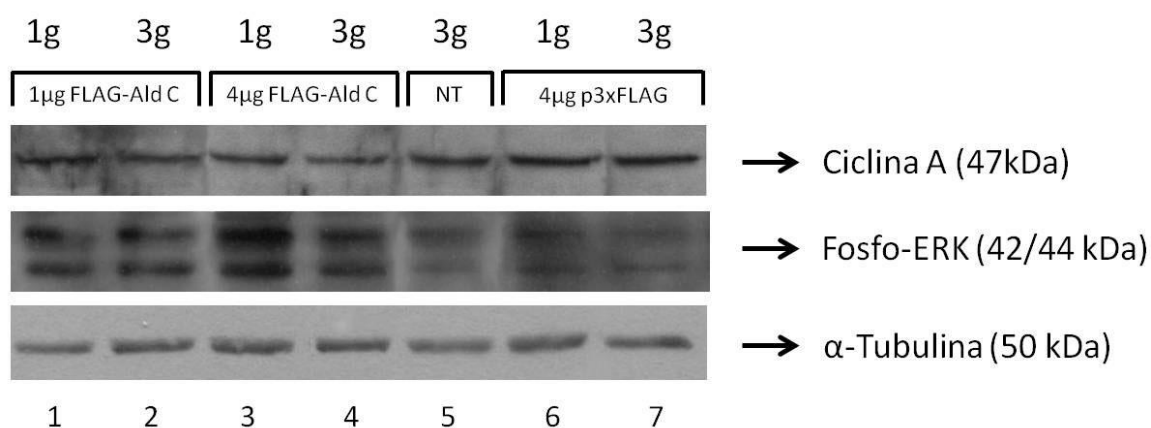


Figura 20: *Western Blot* relativo all'espressione nel citosol delle proteine ciclina A e fosfo-ERK in cellule PC12 a seguito della over-espressione di aldolasi C. Nelle piste 1 e 2 sono stati caricati gli estratti citosolici ottenuti dalle cellule PC12 trasfettate con 1 µg del costrutto p3xFLAG-Aldolasi C (FLAG-Ald C) e raccolte ad 1 giorno (1g) e a 3 giorni (3g) dalla trasfezione. Nelle piste 3 e 4 sono stati caricati gli estratti citosolici ottenuti dalle PC12 trasfettate con 4 µg del costrutto e raccolte ad 1 giorno (1g) e a 3 giorni (3g) dalla trasfezione. Nelle piste 5, 6 e 7 sono stati caricati rispettivamente gli estratti citosolici ottenuti dalle cellule PC12 non trasfettate e dalle cellule trasfettate con il vettore vuoto e raccolte ad un giorno e a 3 giorni dalla trasfezione. La proteina α tubulina è stata utilizzata come normalizzatore nelle analisi densitometriche.

I risultati mostrano che all'aumento dell'espressione della proteina FLAG-aldolasi C (figura 19; piste 1-4) corrisponde una riduzione della proteina ciclina A a 3 giorni dalla trasfezione, ed un aumento dell'espressione della proteina fosfo-ERK che risulta più marcato ad un giorno dalla trasfezione (figura 20; piste 1-4. Figure 21 e 22).

I grafici delle figure 21 e 22 sono stati ottenuti a partire dai dati rilevati mediante le analisi di *Western Blot* i cui risultati sono mostrati in figura 20. Nelle piste 1, 2, 3, 4 sono stati caricati gli estratti citosolici ottenuti dalle cellule PC12 a 1 e 3 giorni dalla trasfezione con 1 µg del costrutto p3xFLAG-Aldolasi C (FLAG-Ald C) (piste 1 e 2) e a 1 e 3 giorni dalla trasfezione con 4 µg dello stesso costrutto (piste 3 e 4). Nelle piste 5, 6 e 7 sono stati caricati rispettivamente gli estratti citosolici ottenuti dalle cellule PC12 non trasfettate e dalle cellule trasfettate con 4 µg del vettore vuoto e raccolte ad un giorno e a 3 giorni dalla trasfezione. La proteina α tubulina è stata utilizzata come normalizzatore nelle analisi densitometriche.

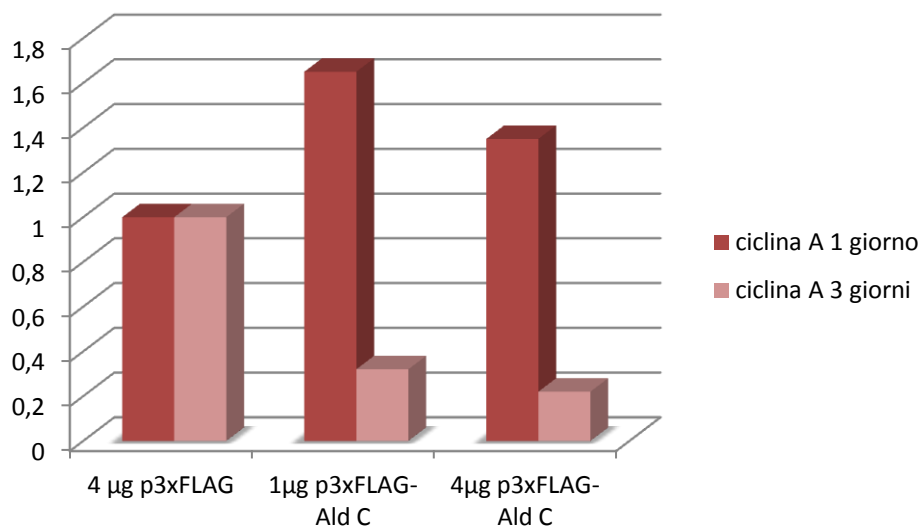


Figura 21: nel grafico sono mostrati i livelli di espressione della proteina ciclina A in estratti citosolici ottenuti da cellule PC12 a seguito della trasfezione di 1 µg e 4 µg del costrutto p3xFLAG-Aldolasi C. I livelli di espressione sono rapportati a quelli basali dopo trasfezione di 4 µg di vettore vuoto (prime 2 barre). È possibile notare che ad un giorno dalla trasfezione (barre scure) i livelli di ciclina A aumentano rispetto al controllo e che a 3 giorni dalla trasfezione (barre chiare) i livelli di ciclina si riducono significativamente come accade nel modello delle PC12 indotte al differenziamento con NGF (figura 18). La riduzione dei livelli di espressione ciclina A è proporzionale alla quantità di vettore p3xFLAG-Aldolasi C trasfettata.

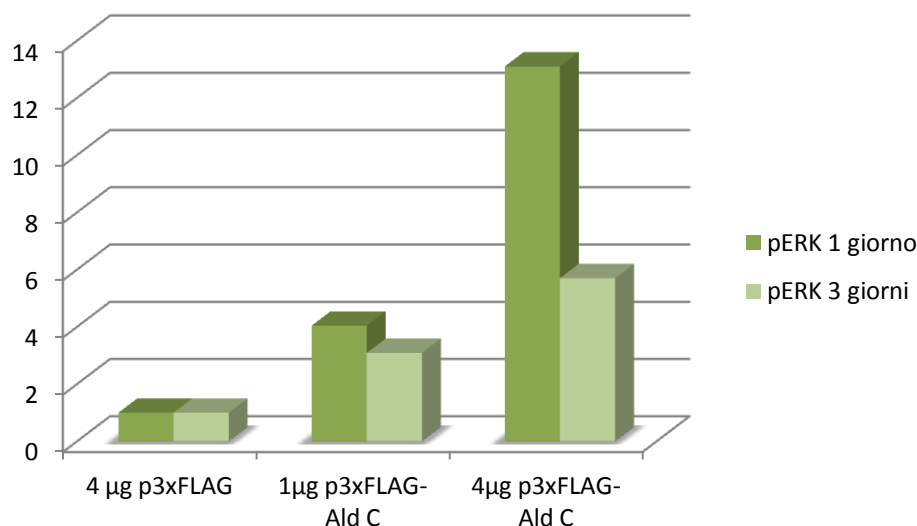


Figura 22: nel grafico sono mostrati i livelli di espressione della proteina fosfo-ERK in estratti citosolici ottenuti da cellule PC12 a seguito della trasfezione di 1 µg e 4 µg del costrutto p3xFLAG-Aldolasi C. I livelli di espressione sono rapportati a quelli basali dopo trasfezione di 4 µg di vettore vuoto (prime 2 barre). È possibile notare che sia ad un giorno (barre chiare) che a 3 giorni (barre scure) dalla trasfezione i livelli di fosfo-ERK aumentano rispetto al controllo, come accade nel modello delle PC12 indotte al differenziamento con NGF (figura 18). L'aumento maggiore è registrato ad un giorno dalla trasfezione. L'incremento dell'espressione di fosfo-ERK è proporzionale alla quantità di vettore p3xFLAG-Aldolasi C trasfettata.

I risultati di questo esperimento suggeriscono che l'aumento di aldolasi C è un processo chiave nel corso del differenziamento in quanto è in grado di indurre una riduzione dei livelli di espressione di ciclina A ed un aumento dei livelli di espressione della proteina fosfo-ERK che è un marcatore precoce del differenziamento neuronale; inoltre, la riduzione dell'espressione di ciclina A e l'aumento dei livelli di espressione di fosfo-ERK risultano essere comunque proporzionali alla quantità di costrutto trasfettato (figure 21 e 22).

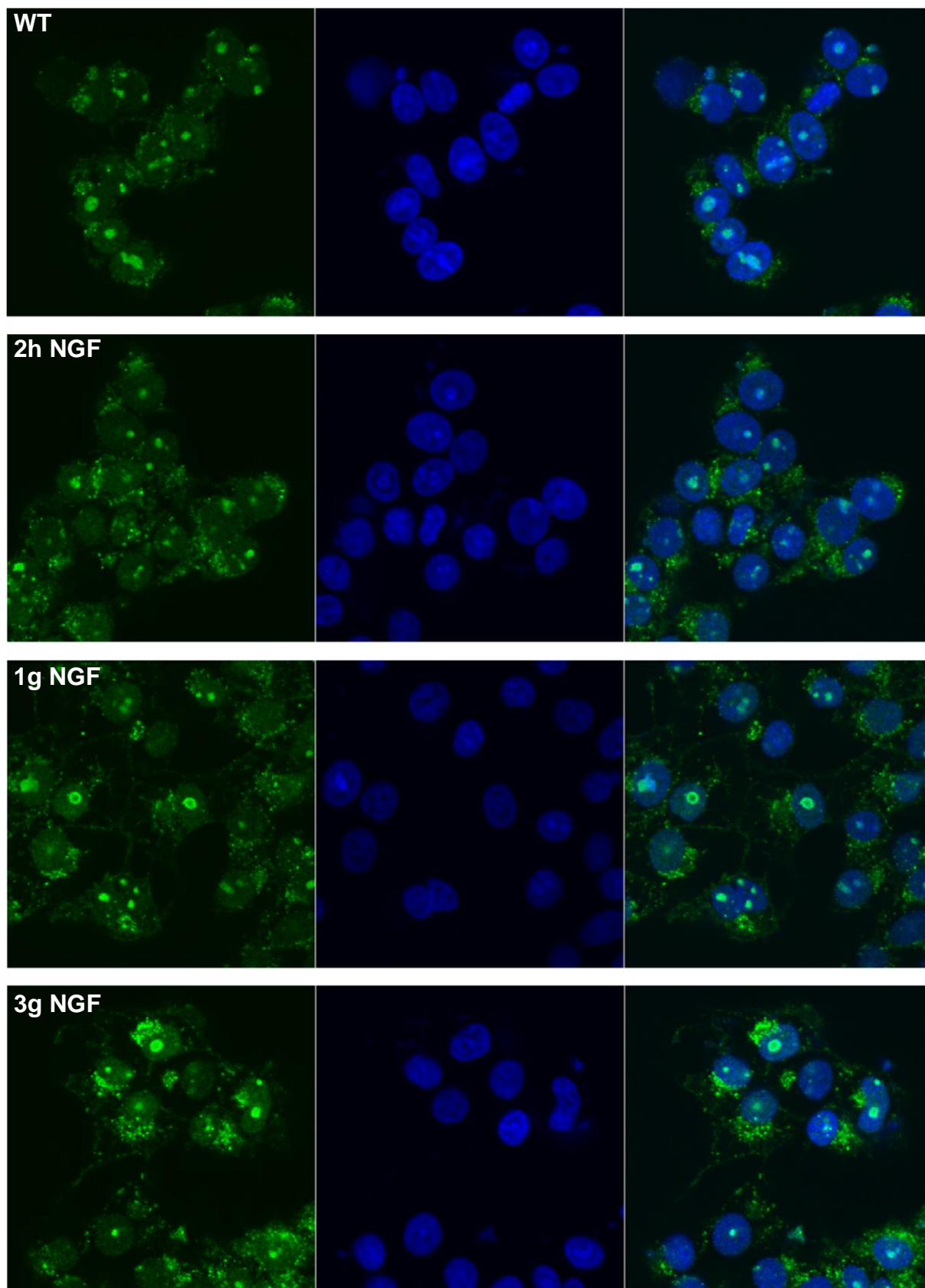
I meccanismi attraverso cui l'aldolasi possa attuare questi effetti sull'espressione delle proteine ciclina A e fosfo-ERK restano tuttavia ancora da chiarire.

4.6. Analisi della compartimentalizzazione cellulare delle proteine aldolasi C e ciclina A in cellule PC12 indotte al differenziamento neuronale con NGF

Ho effettuato alcuni esperimenti di immunofluorescenza al microscopio confocale per valutare la compartimentalizzazione cellulare delle proteine aldolasi C e ciclina A. Gli esperimenti sono stati condotti su cellule PC12 in diversi momenti del differenziamento neuronale indotto mediante NGF. Gli esperimenti mostrati rappresentano un punto di partenza per la messa a punto di esperimenti di co-immunofluorescenza. Nelle figure 23 e 24 sono mostrate le immagini delle immunofluorescenze relative alle 2 proteine effettuate su cellule PC12 indotte al differenziamento. Per la proteina aldolasi C abbiamo utilizzato un anticorpo secondario marcato con il fluorocromo cianina 2, dunque il segnale della proteina è osservabile in verde, per la proteina ciclina A abbiamo utilizzato un anticorpo secondario marcato con il fluorocromo cianina 3, il segnale è dunque osservabile in rosso. In blu è possibile osservare i nuclei cellulari colorati con il reagente DAPI.

In figura 23 si osserva che l'aldolasi C (in verde) nelle cellule non trattate (WT in figura) appare distribuita nel nucleo e nel citosol. Nel nucleo la proteina appare addensata in alcune aree circoscritte. A 2 ore dal trattamento (in figura 2h NGF) la proteina appare essere distribuita ampiamente nel citosol pur mantenendo inalterata la sua quota nucleare, la quota citosolica aumenta soprattutto nelle zone a ridosso del nucleo, dove sono ancora apprezzabili le aree in cui la proteina appare addensata. Dopo un giorno di trattamento con NGF (in figura 1g NGF) appaiono evidenti i cambiamenti morfologici indotti dall'NGF: nell'immagine possono essere apprezzati i prolungamenti cellulari. La proteina aldolasi C appare infatti espressa anche nei prolungamenti che si dipartono dal corpo cellulare. Resta abbondante l'espressione della proteina all'interno del nucleo in cui appare sempre addensata. Un quadro simile è osservabile anche nelle cellule trattate con NGF per 3 giorni: l'espressione appare elevata nelle zone subito a ridosso del nucleo, nel nucleo e nel citosol.

Nella figura 24 osserviamo in rosso il segnale relativo alla proteina ciclina A. Nelle cellule non trattate l'espressione della proteina appare esclusivamente nucleare. Nelle cellule trattate per 2 ore è possibile osservare un debole segnale nel citosol anche se la proteina appare prevalentemente nucleare. Dopo 1 giorno e 3 giorni di trattamento con NGF il segnale della proteina torna ad essere quasi esclusivamente nucleare.



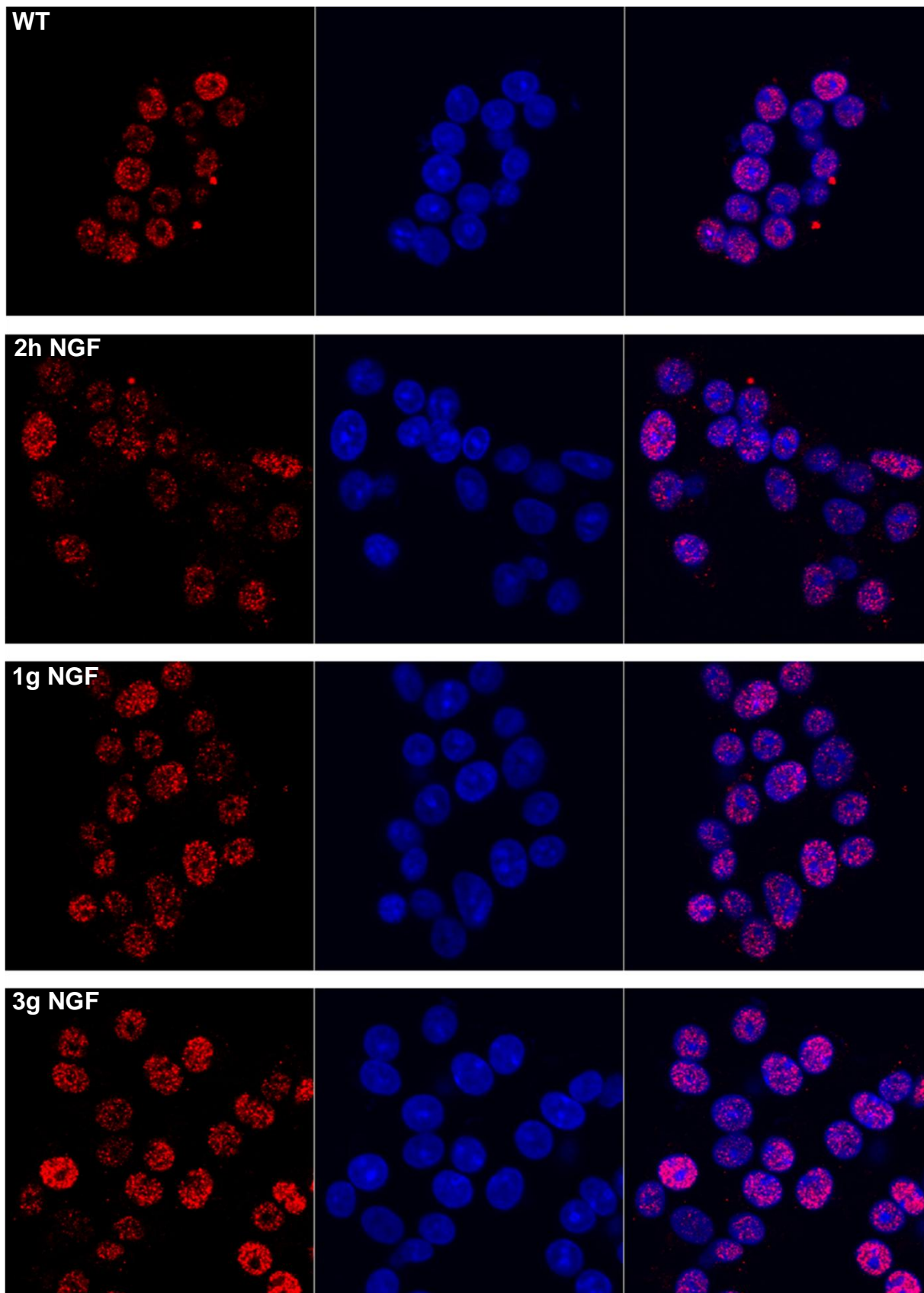


Figure 23 e 24: esperimenti di immunofluorescenza effettuati su cellule PC12 indotte al differenziamento neuronale con NGF. Gli esperimenti sono stati effettuati in differenti momenti del differenziamento neuronale indotto da NGF: in cellule non trattate (WT), a 2 ore (2h NGF) ad un giorno (1g NGF) e a 3 giorni (3g NGF) dal trattamento con NGF. In figura 23 osserviamo i segnali relativi alla proteina aldolasi C in verde, in figura 24 quelli relativi alla proteina ciclina A in rosso. In blu osserviamo i nuclei cellulari marcati con il colorante DAPI.

Nel corso del differenziamento neuronale la distribuzione cellulare delle proteine varia considerevolmente. Gli esperimenti non sono stati condotti sulla proteina NPDC1 in quanto nei tempi considerati la proteina non risulta rilevabile.

Effettuare le analisi durante il differenziamento ci aiuta a capire in quale momento le proteine si trovano ad interagire, informazione determinante per comprendere meglio il ruolo funzionale della proteina aldolasi C in questo processo.

5. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Il progetto di ricerca sugli interattori molecolari della proteina aldolasi C ha gettato importanti basi per comprendere le funzioni nascoste della proteina. Gli interattori della proteina aldolasi C che ho caratterizzato e descritto in questo elaborato di tesi, cioè le proteine NPDC1 e ciclina A, hanno un ruolo nel complesso processo del differenziamento neuronale. L'inattivazione della proteina ciclina A e la successiva inibizione trascrizionale, assieme all'espressione della proteina NPDC1, sono processi indispensabili affinché i precursori neuronali smettano di dividersi ed inizino a differenziare.

I risultati ottenuti dimostrano che la proteina aldolasi C è coinvolta nel differenziamento neuronale indotto da NGF, in vitro, su cellule PC12. Infatti i livelli di espressione della proteina aldolasi C crescono nel corso del differenziamento insieme ai livelli di espressione del *marker* precoce di differenziamento neuronale fosfo-ERK contrariamente ai livelli di espressione di ciclina A che invece diminuiscono.

I risultati ottenuti dimostrano anche un ruolo attivo di aldolasi C nel differenziamento neuronale indotto da NGF. Infatti, l'over-espressione di aldolasi C è in grado di indurre l'espressione di fosfo-ERK, e di ridurre l'espressione di ciclina A nel citosol.

Per confermare ulteriormente i dati ottenuti effettueremo alcuni esperimenti di RNA *interference*, volti a silenziare il gene di aldolasi C in modo da capire se silenziando aldolasi C, in cellule indotte al differenziamento neuronale, l'effetto risulta revertito ovvero che si riesca a ottenere un ridotto aumento dell'espressione di fosfo-ERK ed una minore riduzione della proteina ciclina A nel citosol.

Effettueremo alcuni esperimenti di co-immunofluorescenza, al fine di capire in quale momento del differenziamento neuronale la proteina aldolasi C interagisce con ciclina A ed NPDC1. Nell'ambito di questi esperimenti vorremmo effettuare anche alcune analisi per studiare il trasferimento di energia per risonanza (FRET) tra 2 fluorocromi idonei, coniugati agli anticorpi secondari utilizzati per le co-immunofluorescenze.

Sulla base delle conoscenze finora acquisite abbiamo formulato alcune ipotesi sul ruolo di aldolasi C, tali ipotesi guideranno le nostre future indagini. È noto che per fare in modo che i precursori neuronali differenzino è necessario che smettano di dividersi e che entrino in fase G0. In questa fase i livelli di espressione della proteina ciclina A sono pari a zero. Prima di raggiungere questa fase riteniamo possibile che la ciclina A venga inizialmente inattivata dal legame con l'aldolasi C. Successivamente, nelle fasi tardive del differenziamento, quando la proteina NPDC1 inizia ad essere espressa ad alti livelli, la trascrizione del gene di ciclina A viene inibita dall'azione operata su E2F1 da NPDC1, ed anche in questo secondo processo l'aldolasi C potrebbe essere necessaria. Questa ipotesi correla anche con i nostri risultati del GST-*pull-down* secondo cui le interazioni di aldolasi C con le 2 proteine risulterebbero essere indipendenti.

Una futura ipotesi di lavoro potrebbe essere quella di chiarire il meccanismo mediante il quale la proteina aldolasi C inibisce la funzione della ciclina A. Nelle fasi iniziali del differenziamento neuronale la proteina ciclina A potrebbe essere sequestrata nel citosol dal legame con aldolasi C, processo che le impedirebbe di svolgere i suoi compiti nel nucleo. Inoltre il legame con l'aldolasi C potrebbe in qualche modo inibirne la fosforilazione. A tal fine effettueremo alcuni esperimenti volti ad osservare come variano i livelli di ciclina A nel nucleo delle cellule PC12 dopo aver over-espresso la proteina aldolasi C.

Per quanto riguarda l'interazione con NPDC1 riteniamo che essa avvenga nelle fasi terminali del differenziamento neuronale, perché è solo allora che la proteina inizia ad essere espressa in modo consistente. Nella fase terminale del differenziamento neuronale l'interazione tra le proteine NPDC1 e aldolasi C avviene nel nucleo. Nel nucleo delle cellule in fase avanzata di differenziamento neuronale la proteina NPDC1 opera un duplice meccanismo inibitorio sull'azione di E2F1: si lega alla proteina inibendone il legame al DNA e si lega al promotore del suo gene inibendone la trascrizione. Sotto il controllo di E2F1 ci sono molti geni importanti per la progressione del ciclo cellulare, tra cui la stessa ciclina A. Una delle ipotesi future di lavoro potrebbe essere quella di verificare se l'aldolasi C medi l'interazione tra le proteine NPDC1 ed E2F1 e che dunque partecipi all'inibizione operata da NPDC1 su E2F1.

La scoperta di queste interazioni condotte dall'aldolasi C ha gettato nuova luce sulla comprensione del ruolo funzionale della proteina nel SNC dei mammiferi e ci ha portato ad ipotizzare un coinvolgimento della proteina nel differenziamento neuronale.

6. BIBLIOGRAFIA

- 1) **Arakaki, T.L., Pezza, J.A., Cronin, M.A., Hopkins, C.E., Zimmer, D.B., Tolan, D.R., Allen, K.N** (2004). *Structure of human brain fructose 1,6-(bis)phosphate aldolase: linking isozyme structure with function*. Journal: Protein Sci. 13: 3077-3084
- 2) **Salvatore F, Izzo P, Paoletta G.** (1986) *Aldolase gene and protein family. Structure, expression and pathophysiology*. Horiz Biochem Biophys. 8:611-665
- 3) **Izzo P., Costanzo P., Lupo A., Rippa E., Paoletta G., Salvatore F** (1988) *Human aldolase A gene. Structural organization and tissue-specific expression by multiple promoters and alternate mRNA processing*. Eur. J. Biochem. 174:569-578.
- 4) **Tolan D.R. and Penhoet E.E.** (1986) *Characterization of the human aldolase B gene*. Mol. Biol. Med. 3:245-264.
- 5) **Cox T.M.** (1994) *Aldolase B and fructose intolerance*. Faseb J. 8, 62-71
- 6) **Rocchi M., Vitale E., Covone A., Romeo G., Santamaria R., Buono P., Paoletta G., Salvatore F.** (1989). *Assignment of human aldolase C gene to chromosome 17, region cen----q21.1*. Hum Genet. 82:279-82.
- 7) **Penhoet E.E. and Rutter W.** (1971). *Catalytic and immunochemical properties of homomeric combination of aldolase subunits*. J. Biol. Chem. 246:318-323.
- 8) **Tolan D.R., Niclas J., Bruce B.D., Lebo R.V.** (1987). *Evolutionary implications of the human aldolase A, B, C and pseudogene chromosome locations*. Am. J. Hum. Genet. 41:907-924.
- 9) **Choi, K.H., Shi, J., Hopkins, C.E., Tolan, D.R., and Allen, K.N.** (2001). *Snapshot of catalysis: The structure of fructose-1,6-(bis)phosphate aldolase covalently bound to the substrate dihydroxyacetone phosphate*. Biochemistry 40: 13868–13875
- 10) **Paoletta G., Buono P., Mancini F.P., Izzo P., Salvatore F.** (1986). *Structure and expression of mouse aldolase genes*. Eur. J. Biochem. 156: 229-235.
- 11) **Kukita A., Mukai T., Miyata T., Hori K.** (1988). *The structure of brain-specific rat aldolase C mRNA and the evolution of aldolase isozyme genes*. Eur. J. Biochem. 171:471-478.
- 12) **Yao DC, Tolan DR, Murray MF, Harris DJ, Darras BT, Geva A, Neufeld EJ.** (2004). *Hemolytic anemia and severe rhabdomyolysis caused by compound heterozygous mutations of the gene for erythrocyte/muscle isozyme of aldolase, ALDOA (Arg303X/Cys338Tyr)*. Blood, 103 (6), 2401.
- 13) **Esposito G, Vitagliano L, Cevenini A, Amelio T, Zagari A, Salvatore F.** (2005). *Unraveling the structural and functional features of an aldolase A mutant involved in the hemolytic anemia and severe rhabdomyolysis reported in a child. Unraveling the structural and functional features of an aldolase A*

mutant involved in the hemolytic anemia and severe rhabdomyolysis reported in a child. *Blood*. Jan 15;105(2):905.

- 14) **Horecker B.L., Tsolas O., Lay C.Y.** (1972). Aldolases. In: *The Enzymes*. Edited by Boyer PD. 3rd Edition. Academic Press, New York. Vol. 7: pp213-258.
- 15) **Santamaria R, Esposito G, Vitagliano L, Race V, Paglionico I, Zancan L, Zagari A, Salvatore F.** (2000). Functional and molecular modelling studies of two hereditary fructose intolerance-causing mutations at arginine 303 in human liver aldolase. *Biochem J.*, 350, 823.
- 16) **Esposito G, Vitagliano L, Santamaria R, Viola A, Zagari A, Salvatore F.** (2002). Structural and functional analysis of aldolase B mutants related to hereditary fructose intolerance. *FEBS Lett.*, 531, 152.
- 17) **Esposito G, Santamaria R, Vitagliano L, Ieno L, Viola A, Fiori L, Parenti G, Zancan L, Zagari A, Salvatore F.** (2004). Six novel alleles identified in Italian hereditary fructose intolerance patients enlarge the mutation spectrum of the aldolase B gene. *Hum. Mutat.*, 24, 534.
- 18) **E. Penhoet, T. Rajkumar, and W. J. Rutter** (1966) *Multiple forms of fructose diphosphate aldolase in mammalian tissues*. *Biochemistry* Penhoet et al. Vol. 56,
- 19) **Skala H., Vibert M., Lamas E., Maire P., Schweighoffer F., Kahn A.** (1987). *Molecular cloning and expression of rat aldolase C messenger RNA during development and hepatocarcinogenesis*. *Eur. J. Biochem.* 163: 513-518.
- 20) **Buono P., Paoletta G., Mancini F.P., Izzo p., Salvatore F.** (1988). *The complete nucleotide sequence of the gene coding for the human aldolase C*. *Nucleic Acids Res.* 16:4733.
- 21) **Buono P., Mancini F.P., Izzo P., Salvatore F.** (1990). *Region within the 5' flanking region of the human aldolase C gene*. *Eur. J. Biochem.* 192: 805-811.
- 22) **Atsuchi Y., Yamana K., Yatsuki H., Hori K., Ueda S., Shiokawa K.** (1994). *Cloning of a brain type aldolase cDNA and changes in its mRNA level during oogenesis and early embryogenesis in Xenopus Laevis*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1218:153-157.
- 23) **Zhang R., Yatsuki H., Kusakabe T., Iwabe N., Miyata T., Imai T., Yoshida M., Hori K.** (1995). *Structures of cDNAs encoding the Muscle-Type and Non-Muscle-Type isoenzymes of Lamprey fructose bisphosphate aldolase and the evolution of aldolase genes*. *Eur. J. Biochem.* 117:545-553.
- 24) **Berardini T.Z., Drygas-Williams M., Callard G.V., Tolan D.R.** (1997). *Identification of neuronal isoenzyme specific residues by comparison of Goldfish aldolase C to other aldolases*. *Comp. Biochem. Physiol.* 117:471-476.
- 25) **Inoue T., Yatsuki H., Kusakabe T., Joh K., Takasaki Y., Nikoh N., Miyata T., Hori K.** (1997). *Caenorhabditis elegans has two isozymic forms, CE-1 and CE-2, of fructose-1,6-bisphosphate aldolase which are encoded by different genes*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 339:226-234.

- 26) Kai T., Sugimoto Y., Kusakabe T., Zhang R., Koga K., Hori K. (1992). *Gene structure and multiple mRNA species of Drosophila melanogaster aldolase generatine three isoenzyme with different enzymatic properties*. J. Biochem. 112: 677-688.
- 27) Popovici T., Berwald-Netter Y., Vibert M., Kahn A., Skala H. (1990). Localization of aldolase C mRNA in brain cells. FEBS Letters. 268:189-193.
- 28) Mukai T., Yatsuki H., Masuko S., Arai Y., Joh K., Hori, K. (1991). The structure of the brain-specific rat aldolase C gene and its regional expression. Biochemical and Biophysical Research Communications 174: 1035-1042.
- 29) Anh A.H., Dziennis S., Hawkes R., Herrup K. (1994). The cloning of zebrin II reveals its identity whith aldolase C. Development 120:2081-2090.
- 30) Leclerc N., Gravel C., Hawkes R. (1988). *Development of parasagittal zonation in the rat cerebellar cortex: MabQ113 antigenic bands are created postnatally by the suppression of antigen expression in a subset of the Purkinje cells*. J. Comp. Neurol. 273:399-420.
- 31) Hawkes R., Herrup K. (1995). Aldolase C/zebrin II and the regionalization of the cerebellum. Journal of Molecular Neuroscience. 6: 147-158.
- 32) Brochu G., Maler L., Hawkes R. (1990). Zebrin II: a polypeptide antigen expressed selectively by Purkinje cells reveals compartments in rat and fish cerebellum. J Comp Neurol 291:538–552.
- 33) Hawkes R, Brochu G, Doré L, Gravel C, Leclerc N. (1992). Zebrins: molecular markers of compartmentation in the cerebellum. In: The cerebellum revisited (Llinás R, Sotelo C, eds), pp 22–55. New York: Springer-Verlag.
- 34) Hawkes R. (1997). An anatomical model of cerebellar modules. Prog Brain Res 114:39–52.
- 35) Hawkes R, Eisenman LM. (1997). Stripes and zones: the origins of regionalization of the adult cerebellum. Perspect Dev Neurobiol 5:95–104.
- 36) Herrup K, Kuemerle B. (1997). The compartmentalization of the cerebellum. Annu Rev Neurosci 20:61–90.

- 37) Oberdick J, Baader SL, Schilling K.** (1998). From zebra stripes to postal zones: deciphering patterns of gene expression in the cerebellum. *Trends Neurosci* 21:383–390.
- 38) Armstrong C, Hawkes R.** (2000). Pattern formation in the cerebellar cortex. *Biochem Cell Biol* 78:551–562.
- 39) Akintunde A, Eisenman LM.** (1994). External cuneocerebellar projections and Purkinje cell zebrin II bands: a direct comparison of parasagittal banding in the mouse cerebellum. *J Chem Neuroanat* 7:75–86.
- 40) Ji Z, Hawkes R.** (1994). Topography of Purkinje cell compartments and mossy fiber terminal fields in lobules II and III of the rat cerebellar cortex: spinocerebellar and cuneocerebellar projections. *Neuroscience* 61:935–954.
- 41) Ozol K, Hayden JM, Oberdick J, Hawkes R.** (1999). Horizontal zones in the vermis of the mouse cerebellum. *J Comp Neurol* 412: 95–111.
- 42) Sillitoe RV, Hawkes R.** (2002). Whole-mount immunohistochemistry: a high-throughput screen for patterning defects in the mouse cerebellum. *J Histochem Cytochem* 50: 235–244.
- 43) Apps R., Hawkes R.** (2009). Cerebellar cortical organization: a one-map hypothesis. *Nature Reviews Neuroscience* 10: 670-681.
- 44) Tano D, Napieralski JA, Eisenman LM, Messer A, Plummer J, Hawkes R.** (1992). Novel developmental boundary in the cerebellum revealed by zebrin expression in the lurcher (Lc/_) mutant mouse. *J Comp Neurol* 323:128–136.
- 45) Sillitoe RV., Gopal N., Joyner AL.** (2009). Embryonic origins of ZebrinII parasagittal stripes and establishment of topographic Purkinje cell projections. *Neuroscience*. 162 (3): 574-88.
- 46) Buono P., D'Armiento F.P., Terzi G., Alfieri A., Salvatore F.** (2002). Differential distribution of aldolase A and C in the human central nervous system. *J. Neurocytology*, 30, 957-965.
- 47) Buono P., Alfieri A. and Salvatore F.** (2008). The human aldolase C gene: Transcriptional regulation and expression in the mammalian central nervous system. *Recent Res. Devel. Biochem.*, 8: ISBN: 978-81-308-0215-2.

- 48) Waragai, M., Nagamitsu, S., Xu, W., Li, Y.J., Lin, X., Ashizawa, T. (2006). *Ataxin 10 induces neuritogenesis via interaction with G-protein beta2 subunit*. J. Neurosci. Res. 15;83(7):1170-8
- 49) Marz P., Probst A., Lang S., Schwager M., Rose-John S., Otten U., Ozbek S. (2004). *Ataxin-10, the spinocerebellar ataxia type 10 neurodegenerative disorder protein, is essential for survival of cerebellar neurons*. The Journal of Biological Chemistry. 279:35542-35550.
- 50) Wakamiva M., Matsuura T., Liu Y., Schuster G.C., Gao R., Xu W., Sarkar P.S., Lin X., Ashizawa T. (2006). *The role of ataxin 10 in the pathogenesis of spinocerebellar ataxia type 10*. Neurology. 67:607-13.
- 51) Matsuura T., Yagamata T., Burgess D.L., Rasmussen A., Grewal R.P., et al. (2000). *Large expansion of the ATTCT pentanucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 10*. Nat Genet 26:191-194
- 52) Mareschi K, Novara M., Rustichelli D., Ferrero I., Guido D. Carbone E., Medico E., Madon E., Vercelli A., Fagioli F. (2006). *Neural differentiation of human mesenchymal stem cells: Evidence for expression of neural markers and eag K⁺ channels*. Types. Exp Hematol.. 34(11): 1563-72.
- 53) Odeltad L., Pålman S., Nilsson K, Larsson E., Läckgren G., Johansson K.E., Hjertén S. Grotte G. (1981). *Neuron-specific enolase in relation to differentiation in human neuroblastoma*. Brain Res.
- 54) Basile, M., Lin, R., Kabbani, N., Karpa, K., Kilimann, M., Simpson, I., Kester, M. (2006) *Paralemmin interacts with D3 dopamine receptors: implications for membrane localization and cAMP signaling*. Arch. Biochem. Biophys.
- 55) Zhang Y, Yang Z, Cao Y, Zhang S, Li H, Huang Y, Ding YQ Liu X (2008). *The HSP40 family chaperone protein DnaJB6 enhances Schlafen1 nuclear localization which is critical for promotion of cell cycle arrest in T-cells*. Biochem J. 15;413(2):239-50.
- 56) Xiong H, Kovacs I, Zhang Z. (2004). *Differential distribution of KCHIPs mRNAs in adult mouse brain*. Brain Res Mol Brain Res. 2004 Sep 28;128(2):103-11.
- 57) LIU Zheng¹, XIAO Xiang-Jun², FAN Fei-Yue¹, SUN Yuan-Ming¹, LI Yu-Min¹, YANG Fu-Jun. (2005). *Experimental study on the new significant function domains of KCHIP1 protein*. Acta Physiologica Sinica, June 25, 2005, 57 (3): 346-348.
- 58) Hui Xiong, Kun Xia, Benshang Li, Guoping Zhao, and Zhuohua Zhang. (2009). *KCHIP1: a potential modulator to GABAergic system*. Acta Biochim Biophys Sin (2009): 295–300.

- 59) **Eric Galiana, Philippe Vernier, Edmond Dupont, Claudine Everard, Pierre Rouget.** (1994). *Identification of a neural-specific cDNA, NPDC1, able to down regulate cell proliferation and to suppress transformation.* Cell Biology Vol.92, pp 1560-1564.
- 60) **Qu X, Zhang C, Zhai Y, Xing G, Wei H, Yu Y, Wu S, He F.** (2001). *Characterization and tissue expression of a novel human gene npdc1.* Gene;264(1):37-44.
- 61) **Dupont E, Sansal I, Evrard C, Rouget P.** (1998). *Developmental pattern of expression of NPDC-1 and its interaction with E2F-1 suggest a role in the control of proliferation and differentiation of neural cells.* J Neurosci Res. 15;51(2):257-67.
- 62) **Evrard C, Rouget P.** (2005). *Subcellular localization of neural-specific NPDC-1 protein.* J Neurosci Res. 15;79(6):747-55.
- 63) **Evrard C, Caron S, Rouget P.** (2004). *Functional analysis of the NPDC-1 gene.* Gene. 8;343(1):153-63.
- 64) **Sansal I, Dupont E, Toru D, Evrard C, Rouget P.** (2000). *NPDC-1, a regulator of neural cell proliferation and differentiation, interacts with E2F-1, reduces its binding to DNA and modulates its transcriptional activity.* Oncogene.;19(43):5000-9.
- 65) **Johnson DG, Schwarz JK, Cress WD, Nevins JR.** (1993). *Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase.* Nature. 23;365(6444):349-52.
- 66) **Müller H, Moroni MC, Vigo E, Petersen BO, Bartek J, Helin K.** (1997). *Induction of S-phase entry by E2F transcription factors depends on their nuclear localization.* Mol Cell Biol. 17(9):5508-20.
- 67) **Spencer ML, Theodosiou M, Noonan DJ.** (2004). *NPDC-1, a novel regulator of neuronal proliferation, is degraded by the ubiquitin/proteasome system through a PEST degradation motif.* J Biol Chem. 27;279(35):37069-78. Epub 2004 Jun 30.
- 68) **Galderisi U., Jori F.P., Giordano A.** (2003). *Cell Cycle regulation and neural differentiation.* Oncogene 22 (33): 5208-19
- 69) **Morgan D.O.** (2007). *The Cell Cycle: principles of Control.* Oxford University Press.
- 70) **Wikipedia.** (2011). *Cyclin.* <http://en.wikipedia.org/wiki/Cyclin>
- 71) **Pagano, M., R. Pepperkok, F. Verde, W. Ansorge, and G. Draetta.** (1992). *Cyclin A is required at two points in the human cell cycle.* EMBO J. 11:961–971.

- 72) **Sweeney, C., M. Murphy, M. Kubelka, S.E. Ravnik, C.F. Hawkins, D.J. Wolgemuth, and M. Carrington.** (1996). *A distinct cyclin A is expressed in germ cells in the mouse.* Development. 122:53–64.
- 73) **Murphy, M.** (1999). *Delayed early embryonic lethality following disruption of the murine cyclin A2 gene.* Nat. Genet. 23:481.
- 74) **Entrez Gene:** CCNA2 cyclin A2.
- 75) **Resnitzky, D., L. Hengst, and S.I. Reed.** (1995). *Cyclin A-associated kinase activity is rate limiting for entrance into S phase and is negatively regulated in G1 by p27Kip1.* Mol. Cell. Biol. 15:4347–4352.
- 76) **Girard, F., U. Strausfeld, A. Fernandez, and N.J. Lamb.** (1991). *Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts.* Cell: 67:1169–1179.
- 77) **Saha, P., J. Chen, K.C. Thome, S.J. Lawlis, Z.H. Hou, M. Hendricks, J.D. Parvin, and A. Dutta.** (1998). *Human CDC6/Cdc18 associates with Orc1 and cyclin-cdk and is selectively eliminated from the nucleus at the onset of S phase.* Mol. Cell. Biol. 18:2758–2767.
- 78) **Petersen, B.O., J. Lukas, C.S. Sorensen, J. Bartek, and K. Helin.** (1999). *Phosphorylation of mammalian CDC6 by cyclin A/CDK2 regulates its subcellular localization.* EMBO J. 18:396–410.
- 79) **Coverley, D., H. Laman, and R.A. Laskey.** (2002). *Distinct roles for cyclins E and A during DNA replication complex assembly and activation.* Nat. Cell Biol. 4:523–528.
- 80) **Furuno, N., N. den Elzen, and J. Pines.** (1999). *Human cyclin A is required for mitosis until mid prophase.* J. Cell Biol. 147:295–306.
- 81) **Geley, S., E. Kramer, C. Gieffers, J. Gannon, J.M. Peters, and T. Hunt.** (2001). *Anaphase-promoting complex/cyclosome-dependent proteolysis of human cyclin A starts at the beginning of mitosis and is not subject to the spindle assembly checkpoint.* J. Cell Biol. 153:137–148.
- 82) **Meraldi, P., J. Lukas, A.M. Fry, J. Bartek, and E.A. Nigg.** (1999). *Centrosome duplication in mammalian somatic cells requires E2F and Cdk2-cyclin A.* Nat. Cell Biol. 1:88–93.
- 83) **Maridor, G., P. Gallant, R. Golsteyn, and E.A. Nigg.** (1993). *Nuclear localization of vertebrate cyclin A correlates with its ability to form complexes with cdk catalytic subunits.* J. Cell Sci. 106:535–544.
- 84) **Hofbauer R., and Dehardt D.T.** (1991). *Cell cycle-regulated and proliferation stimulus-responsive genes.* Crit Rev. eukariot. Gene Expr., 1,247-300.

- 85) Duronio R.J. and O'Farrell P.H. (1994).** *Developmental control of a G1-S transcriptional program in Drosophila.* Development, 120,1503-1515.
- 86) Di Domenico F., Sultana R., Barone E., Pierluigi M., Cini C., mancuso C., Ci J., Pierce W.M., Butterfield D.A. (2011).** *Quantitative proteomics analysis of phosphorylated proteins in the hippocampus of Alzheimer's disease subjects.* Jurnal of proteomics, 74, 1091-1103.

7. APPENDICE: pubblicazioni e comunicazioni prodotte durante il dottorato



SOCIETÀ ITALIANA DI BIOCHIMICA
E BIOLOGIA MOLECOLARE
Ente morale dal 1993

55th

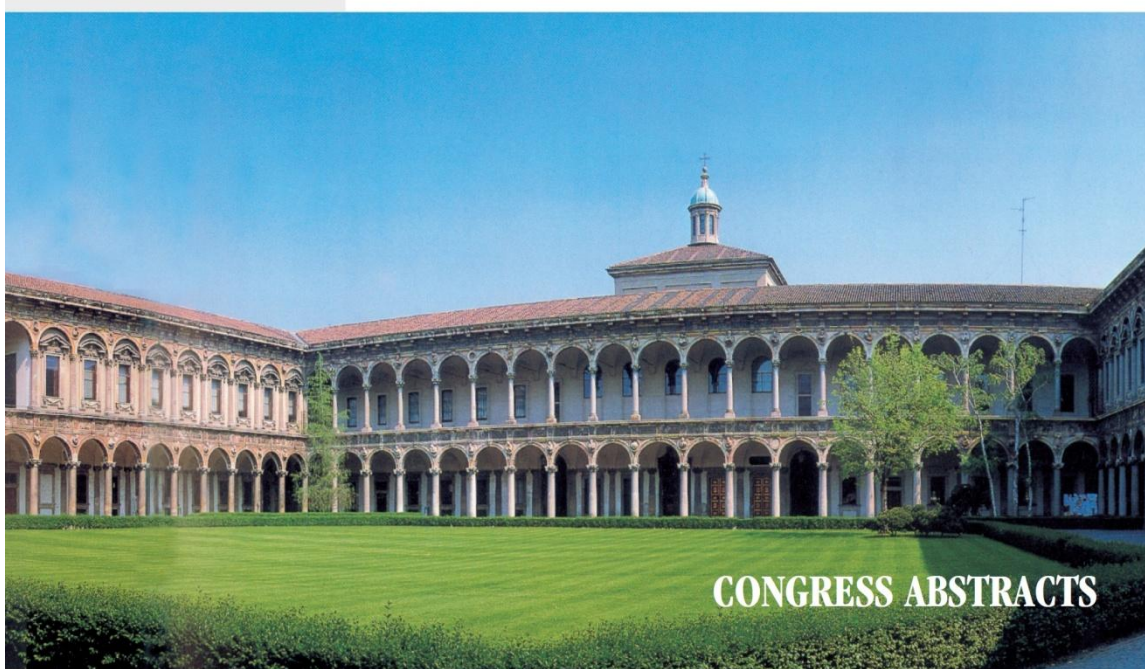
National Meeting
of the Italian Society
of Biochemistry and
Molecular Biology(SIB)



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI MILANO

University of Milan

14th-17th September 2010



CONGRESS ABSTRACTS

55th National Meeting of the Italian Society of Biochemistry and Molecular Biology (SIB)

**University of Milan
14rd – 17rd September 2010**

Neural Proliferation Differentiation and Control 1 (NPDC1) and Cyclin A are interactors of with Aldolase C in mouse brain

R. Palomba¹, A. Alfieri², A. Mancini³, P. Buono^{1,2,3} and F. Salvatore^{1,4}

¹DBBM Università “Federico II”, ²Università “Parthenope”, ³IRCCS Fondazione SDN,

⁴CEINGE Biotecnologie Avanzate; Napoli.

Aldolase C protein is the brain isoform of aldolase enzyme expressed in restricted areas of adult mammalian brain. Despite it's peculiar expression, an additional functional role of aldolase C protein is yet unknown (1,2). In this attempt we screened an adult mouse brain cDNA library using yeast two hybrid assay in order to identify aldolase C specific interactors. One of the specific interactor identified was Neural Proliferation Differentiation and Control 1 (NPDC1) protein. We confirmed the NPDC1-Aldolase C interaction by GST pull down assay. Further in silico analysis predicted Cyclin A-Aldolase C interaction. We confirmed this interaction by GST pull down assay. Cyclin A is involved in cell cycle progression (3). NPDC1 is involved in the neural terminal differentiation and inhibits cell proliferation (4). This results support the idea that Aldolase C could be involved in neuronal differentiation.

References:

1. Buono P. et al., *J. of Neurocytology* (2001)
2. Buono P. et al., *Recent Res. Devel. Biochem* (2008)
3. Tsang W.Y. et al. *J. of Cell Biology* (2007)
4. Dupont E. et al., *J. of Neuroscience Research* (1998)

Acknowledgements:

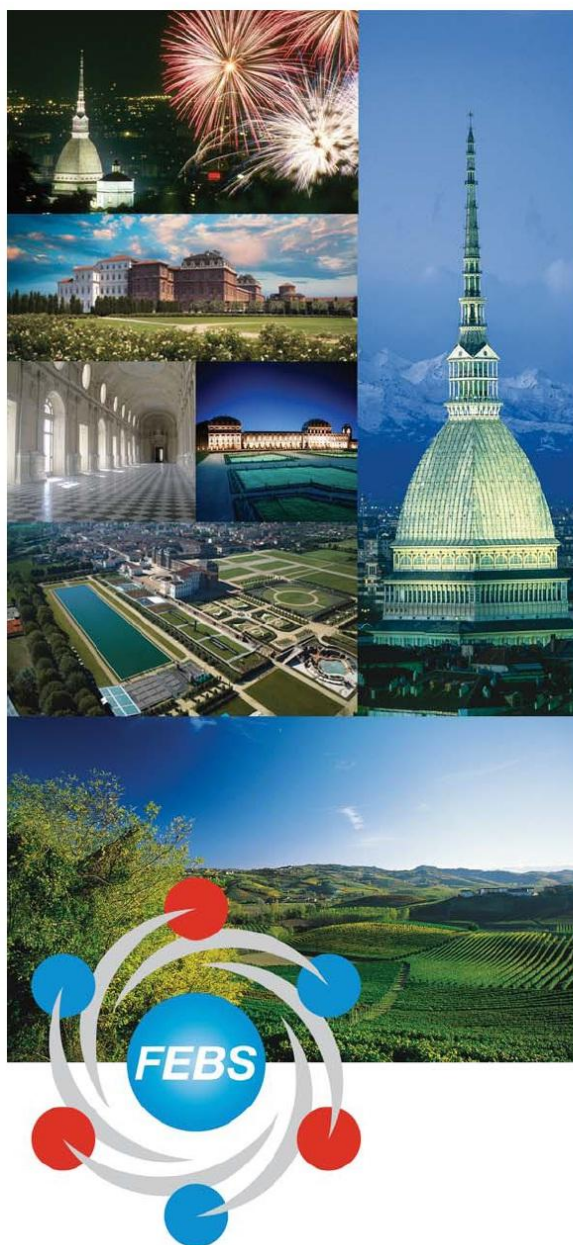
work supported by grants from Regione Campania (convenzione CEINGE-Regione Campania, G.R. 20/12/2004 n.2495) and from Regione Campania LR n.5/2002-2005

Organised by



www.febs2011.it

36th FEBS CONGRESS



**Biochemistry for
Tomorrow's Medicine**

Torino, Italy - June 25-30, 2011

36th FEBS Congress: Biochemistry for Tomorrow's Medicine

Torino

25 – 30 June 2011

Neural Proliferation Differentiation and Control 1 (NPDC1) and cyclin A proteins interact with aldolase C in mouse brain and Neuro2A cells

Roberto Palomba¹, Andreina Alfieri^{1,2,3}, Annamaria Mancini^{1,2}, Pasqualina Buono^{1,2,3} and Francesco Salvatore^{1,3}

¹Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università “Federico II”; ²Dipartimento di Studi delle Istituzioni e dei Sistemi Territoriali Università “Parthenope”; ³CEINGE Biotecnologie Avanzate, Napoli.

Aldolase C protein is the brain isoform of the aldolase enzyme that is expressed in restricted areas of the adult mammalian brain. Because of its stripe-like expression, an additional functional role has been envisaged for the aldolase C protein (1, 2). To investigate this role we screened an adult mouse brain cDNA library using the yeast two-hybrid assay to identify aldolase C specific interactors. Sixty putative molecular interactors were identified. Of these, we focused on the NPDC1 protein, which is involved in neural terminal differentiation and inhibition of cell proliferation (3). We confirmed the NPDC1-aldolase C interaction by GST pull-down assay. We incubated the GST-NPDC1 fusion protein with mouse brain and Neuro2A cells extracts. We also performed an *in-silico* analysis of the putative aldolase C interactors using the IPA software. The output predicted the putative cyclin A–aldolase C interaction. Cyclin A is involved in cell cycle progression; during neuro-differentiation cyclin A expression decreases and neurons stop dividing and start to differentiate (4). We confirmed this interaction by GST pull-down assay and co-immunoprecipitation experiments. In GST pull-down experiments we incubated mouse brain and Neuro2A cell extracts with 3 baits: GST-cyclin A, GST-aldolase C and GST-aldolase C fragment (35aa C-terminal domain). We performed co-immunoprecipitation assays with total, nuclear and cytosolic extracts from Neuro2A and from mouse brain extracts using a monoclonal anti-aldolase C antibody. Our results support that aldolase C is involved in neuronal differentiation suggesting an additional role of the protein in the central nervous system.

1. Buono P. et al. *J. of Neurocytology*, 2001
2. Buono P. et al. *Recent Res. Devel. Biochem*, 2008
3. Dupont E. et al. *J. of Neuroscience Research*, 1998
4. Tsang W.Y. et al. *JCB*, 2007

Work supported by grants from Regione Campania (RC) (conv. CEINGE-RC, G.R. 20/12/2004 n.2495).
From RC LR n.5/2002-2005

RINGRAZIAMENTI

Il valore intrinseco in ciò che si impara è immenso, perché ciascun cammino percorso e ciascuna esperienza vissuta lasciano un'impronta che resta e potrà essere trasmessa. Questo è lo spirito con cui quotidianamente ho lavorato in questi anni, imparando e trasmettendo. Ciò è stato possibile grazie alla disponibilità e all'apertura che ho trovato nelle persone con cui quotidianamente ho portato avanti questi studi e non solo. Ciò che mi resterà più di ogni altra cosa da questa esperienza è quanto la reciprocità possa rendere esponenzialmente maggiori le forze messe in gioco, da ciascuno ci sarà sempre qualcosa da imparare indipendentemente dal suo ruolo formale. Sono convinto che questa sia una legge applicabile a qualunque campo che in un campo complesso come la ricerca scientifica ha una grande valenza. Ringrazio dunque i miei colleghi e i miei tutor per avermi fatto crescere professionalmente promuovendo confronti produttivi ed aperti.

Ringrazio in particolare Andreina, Annamaria e Laura, per avermi guidato e per avermi da subito accolto come uno di loro, senza dimenticare il valido supporto di Valentina, Antonella, della Prof. Arcone, della Prof. Ruoppolo e di Raffaele. Ringrazio inoltre i ragazzi con il cui grande aiuto questo lavoro è stato realizzato: Manuela, Lidia ed in particolare Mara. Un ringraziamento speciale va alla Prof. Buono ed al Prof. Salvatore, guide insostituibili.

Ringrazio inoltre Dino e Francesca per tutti gli utilissimi suggerimenti e per le nostre conversazioni ai confini della scienza, assieme a Tiziana, Dario, Marcella, Mimmo, Valentina, Martina, Antonella, Sonia, Francesco, Ilaria ed Angelo.

Ringrazio inoltre la mia famiglia per il suo immenso e forse inconsapevole supporto che da sempre mi dona, e Roberta che mi ha insegnato tanto in questo percorso. Ringrazio inoltre gli amici, quelli di sempre, forte presenza nella mia vita.